CHROMATOGRAPHISCHE UND NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM TRENNMECHANISMUS AN REVERSED-PHASE-MATERIALIEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ARAN PAULUS

aus Völklingen-Saar

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0054

CHROMATOGRAPHISCHE UND NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM TRENNMECHANISMUS AN REVERSED-PHASE-MATERIALIEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ARAN PAULUS

aus Völklingen-Saar

1986

Tag der mündlichen Prüfung:	4. Juli 1986
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Juni 1983 bis März 1986 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer, danke ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung bei der Beschaffung der apparativen Ausrüstung des Labors, für seine hilfreiche Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für die Förderung der Diskussion mit den Mitgliedern anderer Arbeitskreise auf Tagungen und Kongressen.

Ich glaube, es ist nicht wichtig für einen Wissenschaftler, ob sich seine eigene Theorie im nachhinein als die richtige erweist. Unsere Experimente werden nicht ausgeführt, um zu entscheiden, ob wir Recht haben, sondern um neues Wissen zu erlangen. Wir tun es nur um des Wissens willen. Es ist in keiner Weise unrühmlich, sich in seinen Theorien und Hypothesen geirrt zu haben. Unsere Hypothesen sind mehr für die Gegenwart als für die Zukunft gedacht. Sie sind notwendig für die Erklärung gesicherter Tatsachen, uns zu beflügeln und mitzureißen und vorallem den Weg zu bahnen in unbekannte Gebiete zu neuen Entdeckungen.

Richard Willstätter
in "Aus meinem Leben" Verlag Chemie,
Weinheim 1949, Seite 363

Die fruchtbarsten Entwicklungen haben sich überall dort ergeben, wo zwei unterschiedliche Arten des Denkens zusammentrafen.

Werner Heisenberg

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Problemstellung	Seite 1
2.	Charakterisierung von reversed-phase-Materialien	6
2.1.	Herstellung stationärer Phasen für die RP-Chromatographie	6
2.1.1.	Anforderungen an Chromatographiephasen in der LC	6
2.1.2.	Stationäre Phasen für die RP-Chromatographie	7
2.1.3.	Synthese von chemisch modifizierten Silicagelen	8
2.1.3.1.	Polymerisation von trifunktionellen Organosilanen	8
2.1.3.2.	Oberflächenmodifizierung von Silicagelen	8
2.1.3.3.	Darstellung von RP-18-Phasen	13
2.2.	Elementaranalyse und BET-Oberflächenbestimmung	14
2.3.	Spektroskopische Verfahren	21
2.3.1.	Festkörper-NMR-Spektroskopie	22
2.4.	Chromatographische Methoden	26
2.4.1.	Bestimmung des Totvolumens und der Totzeit bei RP-Phasen	28
2.4.1.1.	Bestimmung des Totvolumens und der Totzeit durch Totzeitmarker	33
2.4.1.2.	Linearisierung von Retentionsdaten homologer Reihen	36
2.4.1.3.	Bestimmung des Totvolumens und der Totzeit aus den Systempeaks	41
2.4.2.	Auswahl eines Testgemischs	43
2.4.3.	Testen kommerzieller RP-Phasen	45
3.	Hydrophobe Wechselwirkungen	51
3.1.	Allgemeines zu Relaxationsmessungen	52
3.2.	NMR-Untersuchungen an RP-Phasen	55
3.2.1.	Vergleich von Festkörper- und Suspensions-NMR-Messungen	55
3.2.2.	Relaxationszeitmessungen an RP-Phasen	58
3.3.	HPLC-Untersuchungen	62
4.	Silanophile Wechselwirkungen	70
4.1.	NMR-Untersuchungen	70
4.1.1.	Allgemeines	70
4.1.2.	Einfluß der Menge an TEA in der Suspensionslösung auf die Relaxation	78
4.1.3.	Adsorption von TEA an verschiedenen Silicagelen	80

4.1.4.	Adsorption anderer basischer Moleküle an Nucleosil	84
4.2.	HPLC-Untersuchungen	89
4.2.1.	Adsorption an Silicagel	89
4.2.2.	Adsorption an RP-Phasen	93
4.2.2.1.	Reversibilität der TEA-Adsorption an RP-Phasen	94
4.2.2.2.	Theoretische Beschreibung der Aminadsorption an RP-Phasen	95
4.2.2.3.	Retention als Funktion der Menge an Base im Trenngemisch	99
4.2.2.4.	Abschätzung der Silanolkonzentration durch chromatographische Messungen	103
4.2.2.5.	Retention als Funktion der Größe und Basizität des Amins in der mobilen Phase	105
4.2.2.6.	Einfluß der stationären Phase	113
5.	Experimenteller Teil	119
5.1.	Darstellung der modifizierten Silicagelphasen	119
5.2.	NMR-Untersuchungen	120
5.2.1.	CP-MAS-NMR-Spektren	120
5.2.2.	Suspensions-NMR-Spektren	121
5.3.	Chromatographische Untersuchungen	121
6.	Dank	123
7.	Zusammenfassung	125
8.	Literaturverzeichnis	128

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In den letzten Jahren ist der Bedarf an analytischen Informationen in Forschung und Technik wie auch in einer breiten Öffentlichkeit stetig angewachsen. Immer vielfältigere analytische Fragestellungen in qualitativer und quantitativer Hinsicht führten zu einer breiten apparativen Entwicklung analytischer Meßgeräte und zu einer Anerkennung der analytischen Chemie als einer eigenständigen Disziplin in Forschung und Anwendung. Während Fortschritte in der qualitativen Analytik sehr eng mit Neuerungen in den verschiedensten Bereichen der Spektroskopie verknüpft sind, wurde die Auftrennung komplexer Stoffgemische immer mehr zu einer Domäne der erstmals 1906 von dem russischen Botaniker Michael Tswett angewandten Chromatographie (1-4).

Die Einführung der Kapillargaschromatographie (5-8) sowie der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (9-13) seit etwa Anfang bis Mitte der 60iger Jahre verstärkte die zentrale Bedeutung der Chromatographie als analytische Trennmethode. Sowohl Kapillargaschromatographie als auch HPLC zeichnen sich durch hohe Trennleistungen und weitreichende Universalität in der Anwendung aus und haben zur Lösung vieler analytischer Probleme wesentliche Beiträge geleistet bzw. haben analytische Untersuchungen überhaupt erst ermöglicht.

Die Entwicklung der modernen Flüssigkeitschromatographie wird vor allem von zwei Zielen gekennzeichnet: erstens der Verbesserung der Trennleistung, Nachweisempfindlichkeit und Analysengeschwindigkeit gegenüber der herkömmlichen Niederdrucksäulenchromatographie um den Faktor 100 (14) und zweitens der Entwicklung von stationären Phasen für die Analyse von polaren, biochemischen oder pharmazeutischen Proben. Die erste Zielsetzung ist eher physikalisch- chemischer Natur und inzwischen mit der Verfügbarkeit von einheitlichen Partikeln mit 3 bis 10 µm Durchmesser in enger Korngrößenverteilung weitgehend gelöst. Die apparativen Anforderungen an Pumpen und Detektoren führten zur Entwicklung entsprechender Geräte, die Analysen unter den oben genannten Gesichtspunkten erlauben.

Der zweite Problemkreis, die Auftrennung polarer Gemische, ist prinzipiell mit sogenannten "reversed-phase-Systemen" möglich - Trennsysteme mit einer unpolaren stationären und einer polaren mobilen Phase. Als stationäre Phase wird heute fast ausschließlich Silicagel verwendet, dessen Oberfläche durch die Umsetzung mit einem

langkettigen Alkylsilan modifiziert wurde. Als mobile Phase dient ein Gemisch aus Wasser und einem organischen Modifier wie Methanol, Acetonitril oder Tetrahydrofuran. Die wichtigste Randbedingung der Chromatographie, die Löslichkeit der (polaren) Probe in der mobilen Phase, ist damit gewährleistet.

Der Begriff "reversed-phase-Chromatographie" (RP-Chromatographie) wurde 1950 von Howard und Martin geprägt, die für die Trennung von Fettsäuren mit der Flüssig-Flüssig-Chromatographie n-Octan als stationäre Phase vorschlugen (15). Obwohl die Begriffswahl für diese Art der Chromatographie lediglich auf die Umkehrung der Polarität von mobiler und stationärer Phase gegenüber damals bekannten Systemen hinweisen sollte, wurde doch mit dieser Technik ein neues Trennprinzip in die Chromatographie eingeführt.

Bei der Ionenaustausch- und der Adsorptionschromatographie (16,17) an polaren stationären Phasen sind die Wechselwirkungskräfte, die für die Trennung verantwortlich sind, auf Anziehungskräfte von Ladungen und Dipolen oder auf Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Im Gegensatz dazu beruhen in der RP-Chromatographie unterschiedliche Aufenthaltszeiten an der stationären Phase auf ungerichteten dispersiven Kräften.

Trotz vieler theoretischer Ansätze zur Erklärung von Retention und Selektivität in der RP-Chromatographie gibt es noch kein allgemeingültiges Modell, das das Verhalten eines Probenmoleküls auf einer RP-Phase bei variabler Zusammensetzung der mobilen Phase voraussagen könnte. Der Trennmechanismus selbst wird als komplexes Phänomen betrachtet, das von molekularen Eigenschaften der zu trennenden Substanzen sowie von Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase abhängig ist.

Bei der Interpretation von vielen Arbeiten, die sich mit dem Trennmechanismus an RP-Phasen befassen, bildet die sogenannte Theorie der Solvophobie von Horvath und Mitarbeitern (18-23) den theoretischen Bezugsrahmen, da sie in vielen Trennsystemen - vor allem denjenigen mit hohem Wassergehalt der mobilen Phase - die Trennung aufgrund physikalischer Eigenschaften der mobilen Phase und der Probenmoleküle erklären kann. Demnach wird die Trennung auf hydrophobe Effekte zurückgeführt, d.h. in dem Gesamtsystem aus polarer mobiler und unpolarer stationärer Phase stoßen sich beide Phasen gegenseitig ab. Die beweglichen unpolaren Alkylliganden orientieren sich soweit als möglich so, daß die Kontaktfläche zur polaren mobilen Phase minimal wird.

Probensubstanzen werden in diesen Prozeß miteinbezogen, indem sich ihre hydrophoben Molekülregionen mit den unpolaren Alkylliganden zusammenlagern und so die hydrophobe Gesamtoberfläche des Systems reduzieren. Die Adsorption an der stationären Phase hängt somit in erster Linie von dem Polaritätsunterschied zwischen mobiler und stationärer Phase ab. Der Polarität der mobilen Phase kommt daher eine zentrale Rolle bei der Erklärung der Retention von Probensubstanzen zu.

Die theoretischen Erklärungsmodelle des chromatographischen Trennprozesses bauen überwiegend auf Eigenschaften der mobilen Phase oder auf molekularen Eigenschaften der Probensubstanzen in der gegebenen mobilen Phase auf. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß sich die Mehrzahl der früheren Arbeiten mit dem Einfluß der Polarität der mobilen Phase auf Retention und Selektivität beschäftigten.

In den quantitativen Struktur-Retentions-Beziehungen (24-32) werden als mögliche Deskriptoren der Retention von Probensubstanzen folgende molekularen Eigenschaften vorgeschlagen: die Löslichkeit der Probensubstanz in der mobilen Phase (24), das van-der-Waals-Volumen und die van-der-Waals-Oberfläche des Probenmoleküls (25,26, 33), die Konnektivität (34), in die die räumlichen Dimensionen eines Moleküls mit eingehen, das Länge-Breite-Verhältnis in einem Molekül, der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in einem n-Octanol-Wasser-Gemisch (35,36), der ein Maß für die Hydrophobie eines Moleküls darstellt, sowie die Anzahl der Wasserstoffakzeptor- oder -donorstellen. Alle quantitativen Struktur-Retentions-Beziehungen gehen von einer einheitlichen und völlig unpolaren stationären Phase aus. Die Probensubstanzen, mit denen diese Modelle überprüft wurden, sind sämtlich unpolare bis schwach polare, aber neutrale Verbindungen.

Während die Trennung neutraler, organischer Substanzen mit der RP-Chromatographie im allgemeinen wenig Probleme bereitet und das chromatographische Verhalten solcher Systeme mit den bestehenden Modellen zum chromatographischen Trennprozeß ausreichend erklärbar ist, treten bei polaren, in der Hauptsache basischen Komponenten im Trenngemisch oft unvorhersehbare Schwierigkeiten auf. Basische Stoffe zeigen häufig ein ausgeprägtes Tailing , "wandern im Chromatogramm", d.h. ändern ihr Retentionsverhalten im Verlauf mehrerer, sukzessiver Injektionen oder werden aufgrund irreversibler Adsorption nicht von der Säule eluiert.

Tailing und irreversible Adsorption deuten daraufhin, daß neben den in der RP-Chromatographie postulierten, schwachen hydrophoben noch andere Wechselwirkungen auftreten. Da die stationäre Phase durch eine nicht vollständige Umsetzung von Silanolgruppen mit Alkylketten entsteht, werden die zusätzlichen Wechselwirkungen freien und im Trennprozeß zugänglichen Silanolgruppen zugeschrieben (37-39). Man hat es daher mit einem gemischten Trennmechanismus aus hydrophoben und silanophilen Wechselwirkungen zu tun. Das Verhältnis beider Trennmechanismen zueinander wird dabei sowohl von der Struktur der stationären als auch von der Zusammensetzung der mobilen Phase bestimmt.

Die Polarität der mobilen Phase beeinflußt die Beweglichkeit der Alkylliganden (40-42) und verändert damit die Abschirmung nicht umgesetzter Silanolgruppen, d.h. ihre Zugänglichkeit für ein Probenmolekül. Die Retention eines Moleküls, das zu einer Adsorption an Silanolgruppen fähig ist, hängt somit neben den hydrophoben Wechselwirkungen von der Zugänglichkeit der SiOH-Gruppen ab, die wiederum von der Zusammensetzung der mobilen Phase beeinflußt wird.

Ohne die dominierende Rolle der mobilen Phase auf das chromatographische Verhalten in Frage zu stellen, richtete sich das Interesse in letzter Zeit immer mehr auf die Struktur der stationären Phase und ihre Rolle im chromatographischen Trennprozeß. Neuere spektroskopische Methoden, wie z.B. die Festkörper-NMR-Spektroskopie (43-52), erlauben die Charakterisierung aller Oberflächenspezies einer RP-Phase.

Durch eine kombinierte Anwendung von spektroskopischen und chromatographischen Methoden hofft man, einen genaueren Einblick in die Mechanismen der Wechselwirkung von Probensubstanzen mit mobiler und stationärer Phase zu erhalten.

Kommerziell erhältliche stationäre RP-Phasen mit einer Octadecylkette (ODS- oder RP-18-Phasen) werden aus Silicagelen unterschiedlicher Oberfläche und Gesamtsilanolgruppenkonzentration mit unterschiedlicher Beladung hergestellt. Testet man diese Phasen mit neutralen, unpolaren oder wenig polaren Substanzen, so ergeben sich zwar Unterschiede in den Retentionsdaten, doch die Elutionsreihenfolge bleibt im allgemeinen gleich. Bei der Chromatographie basischer Substanzen aber zeigen die ODS-Phasen verschiedener Hersteller oft drastische Verschiebungen sowohl der Selektivität als auch der Retention (51).

Da viele pharmazeutische und biochemische Wirksubstanzen ein oder mehrere basische Zentren besitzen, ist ihr chromatographisches Verhalten sehr häufig nicht vorhersehbar. Durch die Unterschiedlichkeit von stationären Phasen, die zwar alle unter dem Label "ODS- oder RP-18-Phase" gehandelt werden, deren reproduzierbares chromatographisches Verhalten aber nicht einmal bei einem standardisierten Herstellungsverfahren garantiert ist, ergeben sich in der Praxis große Schwierigkeiten bei der Ausarbeitung von Trennungen. So sind bereits ausgearbeitete Trennungen nicht ohne weiteres von einer ODS-Phase auf eine andere zu übertragen. Bei der Ausarbeitung selbst leiten häufig das empirische Wissen und der Zufall die Wahl der Trennbedingungen. Ein weiteres Problem ist die Alterung von Säulenmaterialien, die im Verlauf mehrerer Wochen ihr chromatographisches Verhalten ändern (53). Bisher gibt es noch keine Anhaltspunkte, warum und in welcher Weise stationäre Phasen altern.

Da durch die NMR-spektroskopischen Methoden die Möglichkeit gegeben ist, RP-Phasen auf ihre Oberflächenspezies hin zu untersuchen, sollten zur Beantwortung der diskutierten Fragen die spektroskopischen Resultate und das chromatographische Verhalten miteinander korreliert werden.

Das Thema dieser Arbeit ist daher eine systematische Untersuchung des Einflusses der stationären Phase auf chromatographische Trennungen im Hinblick auf die in Frage kommenden Wechselwirkungsmechanismen. Neben einer möglichst vollständigen Charakterisierung der stationären Phasen steht das dynamische Verhalten aller an einer Trennung beteiligten Spezies im Mittelpunkt des Interesses. Das Verständnis der silanophilen Wechselwirkungen und ihr Einfluß auf die Trennung, für die es bisher noch kein theoretisches Konzept gibt, bildet den Schwerpunkt des zweiten Teils der Arbeit. Auch auf eine mögliche Manipulation des Verhaltens basischer Substanzen auf einer ODS-Phase und auf die Unterschiedlichkeit kommerzieller ODS-Phasen, die unter gleichen Trennbedingungen unterschiedliche Trennergebnisse liefern, soll eingegangen werden.

2. CHARAKTERISIERUNG VON REVERSED-PHASE-MATERIALIEN

2.1. HERSTELLUNG STATIONÄRER PHASEN FÜR DIE RP-CHROMATOGRAPHIE

2.1.1. Anforderungen an Chromatographiephasen in der LC

Damit ein Material als stationäre Phase zu HPLC-Trennungen eingesetzt werden kann, sollte es bestimmte physikalische und chemische Kriterien erfüllen. Um bei gegebener Säulenlänge eine hohe Trennleistung zu erzielen, muß die Anzahl der Trennstufen einer Säule groß und die Höhe eines theoretischen Bodens klein sein. Für gepackte Säulen beschreibt die van-Deemter-Gleichung (54,55) den Zusammenhang zwischen der Bodenhöhe h und der linearen Fließgeschwindigkeit u, dem Diffusionskoeffizienten D_m, der Eddydiffusion λ, geometrischen Faktoren w und y und dem Partikeldurchmesser dp.

$$1) \quad h = \frac{2\,dp}{\lambda} + \frac{2\,y\,D_m}{u} + \frac{w\,dp^2\,u}{D_m}$$

Dabei zeigt sich, daß die Bodenhöhe dem Quadrat der Partikelgröße proportional ist. Je kleiner die Partikel in der gepackten Säule sind, umso größer ist die Trennleistung. Andererseits wächst aber auch der aufzuwendende Druck für eine konstante Fließgeschwindigkeit reziprok zum Quadrat der Partikeldurchmesser (56). In der Praxis haben sich Teilchen von 3 - 10 µm Durchmesser bewährt, die mit den zur Verfügung stehenden Geräten bei optimalen Fließgeschwindigkeiten der mobilen Phase eingesetzt werden können. Das Gerüst der stationären Phase sollte mechanisch genügend stabil sein, um auftretende Druckabfälle von 100 bis 400 bar ohne Schaden zu überstehen.

Um sehr ähnliche Substanzen voneinander zu trennen, müssen auf der stationären Phase möglichst viele Wechselwirkungsstellen vorhanden sein. Man verwendet daher poröses Material mit einer inneren Oberfläche von 50 bis 500 m^2/g. Allerdings müssen die Poren dieses Materials für alle zu trennenden Substanzen zugänglich sein, d.h. die mittlere Porengröße sollte für Trennungen niedermolekularer Verbindungen mit einem Molekulargewicht bis etwa 1000 g/mol 50 Å oder besser 100 Å betragen. Für die Trennung großer Biopolymere werden Porenweiten von 300 Å benötigt.

Schließlich muß die stationäre Phase gegenüber den verwendeten mobilen Phasen und Probensubstanzen chemisch inert sein, damit es nicht zu undefinierten Änderungen der Oberflächeneigenschaften der stationären Phase kommt. Dadurch wäre die Reproduzierbarkeit der Trennbedingungen nicht mehr gewährleistet.

2.1.2. Stationäre Phasen für die RP-Chromatographie

Für die RP-Chromatographie sollte die stationäre Phase eine vollständig unpolare Oberfläche aufweisen. Es wurden verschiedene Materialien dafür vorgeschlagen, so z.B. Kohlenstoffphasen (57-59), RP-Phasen auf Polymerbasis (60) sowie modifizierte Silicagelphasen. Keines dieser Materialien erfüllt die oben angeführten Kriterien in optimaler Weise.

Kohlenstoffphasen, die z.B. durch gezielte Pyrolyse darstellbar sind, haben eine einheitliche und völlig unpolare Oberfläche und sind chemisch äußerst inert. Es bereitet jedoch Schwierigkeiten, Materialien mit einer geeigneten Porenstruktur (Porengröße und -größenverteilung) zu erhalten. RP-Phasen auf Polymerbasis sind durch Kopolymerisation von Styrol und Divinylbenzol und anschließende Einführung einer Chlormethylgruppe zugänglich, die sich weiter modifizieren läßt. Sie lassen sich in geeigneter Teilchen- und Porengröße herstellen, sind jedoch in den meisten Fällen nicht ausreichend druckstabil oder quellen beim Wechsel der mobilen Phase.

Modifizierte Silicagelphasen zeigen eine ausreichende Druckstabilität, Oberfläche und Porengröße sind in weiten Grenzen genau einstellbar, aber die unpolare Oberfläche ist durch die grundsätzlich unvollständige Modifizierung nicht einheitlich. Zudem wird das Silicagelgerüst bei alkalischen pH-Werten größer als 9 zerstört, so daß man bei der Wahl der mobile Phase auf einen pH-Bereich von 2 bis 8 beschränkt ist.

Trotz nicht einheitlicher Oberflächenstruktur und Einschränkungen in der Wahl der mobilen Phase sind RP-Phasen auf Silicagelbasis die am häufigsten verwendeten RP-Phasen. Sie sind kommerziell in vielfacher Abstufung bezüglich Teilchengröße, Oberfläche, Porengröße und Art und Weise der Modifizierung erhältlich und werden unter Routinebedingungen für RP-Trennungen fast ausschließlich eingesetzt.

2.1.3. Synthese von chemisch modifizierten Silicagelen

2.1.3.1. Polymerisation von trifunktionellen Organosilanen

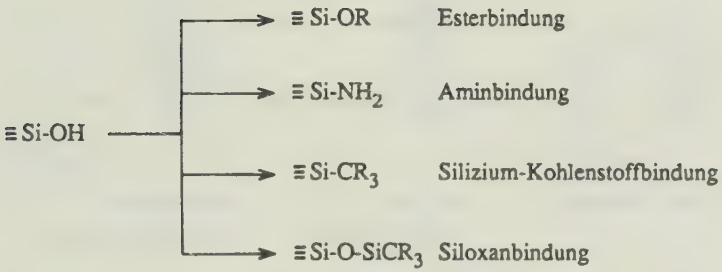
Die Herstellung von RP-Phasen auf Kieselgelbasis ist von zwei unterschiedlichen Ansätzen her möglich (61). Silicagel ist durch eine Polykondensation von $Si(OH)_4$ unter definierten Reaktionsbedingungen zugänglich. Eine Übertragung dieser Herstellungsweise auf RP-Phasen sollte bei Verwendung von Alkylsilanen möglich sein. Bei der gezielten Hydrolyse und Kondensation von Silanen des Typs $RSiCl_3$ entstehen jedoch Produkte mit geringer Oberfläche. Erst die kombinierte Hydrolyse und Kondensation von Organotrialkoxysilanen mit Tetraethoxysilan erlaubt die Synthese von stationären Phasen, die sich in Teilchengröße, Oberfläche und Porenstruktur chromatographischen Anforderungen anpassen lassen. Auch der organische Rest des Silans ist in weiten Grenzen variierbar (61,62).

Dennoch hat sich diese Herstellungsmethode für RP-Phasen bisher noch nicht durchgesetzt, da die entstehenden Phasen entweder eine geringe Beladung mit Alkylgruppen oder eine polymere Struktur der Oberflächenalkylgruppen aufweisen. Polymere Phasen zeigen aber bedingt durch langsame Diffusionsraten in die stationäre Phase eine schlechtere Effizienz als monomere Phasen.

2.1.3.2. Oberflächenmodifizierung von Silicagelen

Einen zweiten Weg zu RP-Phasen eröffnet die Modifizierung von Kieselgelen, die schon die notwendigen chromatographischen Eigenschaften besitzen - Teilchengröße 3 - 10 µm, Oberfläche 50 - 500 m^2/g, Porenvolumen 0.5 - 2 ml und mittlerer Porendurchmesser 50-300 Å.

Die Modifizierung der Kieselgele erfolgt durch eine Umsetzung der Oberflächensilanolgruppen. Die organische Einheit kann über vier verschiedene Arten an das Kieselgelgerüst angebunden werden:



Bei der Darstellung der Esterphasen reagiert das Kieselgel direkt mit einem Alkohol (63). Die Silizium-Stickstoff-(64) und die Silizium-Kohlenstoffbrücke (65) wird in zwei Schritten gebildet: eine Umsetzung des Kieselgels mit Thionylchlorid ($SOCl_2$) ergibt ≡Si-Cl Gruppen an der Oberfläche, die in einer zweiten Reaktion mit Aminen bzw. metallorganischen Verbindungen wie Grignardderivaten oder Organolithiumverbindungen das modifizierte Kieselgel ergeben. Da sowohl Ester-, Amin- wie direkt am Gerüstsilizium gebundene Kohlenstoffphasen nur eine geringe Hydrolysestabilität aufweisen und daher heute nicht mehr verwendet werden, wird hier nicht mehr näher auf diese Phasen eingegangen.

Der heute übliche Weg zur Herstellung einer RP-Phase ist die Reaktion eines Silans R_nSiX_{4n} (n = 1,2 oder 3) mit den Silanolgruppen an der Oberfläche des Kieselgels unter Abspaltung von HX und der Ausbildung einer Siloxanbindung. Die so hergestellten, modifizierten Kieselgele sind bei üblichen mobilen Phasen von pH 2 bis pH 9 stabil.

In Abbildung 1 sind die möglichen Spezies an der Oberfläche eines Silicagels dargestellt. Neben Siloxaneinheiten und freien Silanolgruppen treten geminale und vicinale Silanolgruppen auf, wobei letztere über Wasserstoffbrücken ein Molekül Wasser adsorbieren können. Die Existenz eines Siliziums mit drei Hydroxylgruppen ist aus sterischen Gründen nicht möglich.

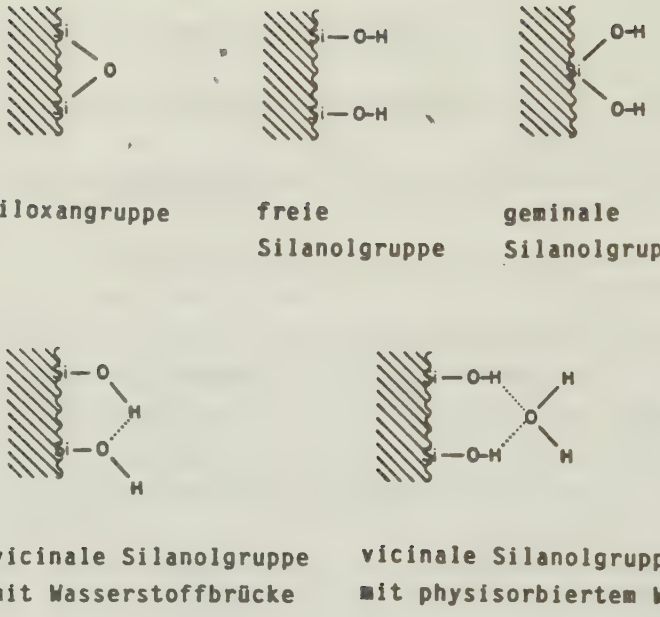


Abbildung 1: Spezies auf der Oberfläche von Silicagelen

Für die Reaktion des Kieselgels mit einem Silan hat man, unabhängig von der Struktur des organischen Liganden, die Möglichkeit, ein mono-, di- oder trifunktionelles Silan einzusetzen.

Während die Reaktion mit einem monofunktionellen Silan (RR'R'SiX) streng nach einer Kinetik 1. Ordnung verläuft (61) und definierte Reaktionsprodukte, nämlich den über eine Siloxanbrücke gebundenen Alkylliganden (siehe Abbildung 2) ergibt, sind Reaktionsweise und -produkte bei Verwendung von di- und trifunktionellen Silanen als Modifier komplizierter.

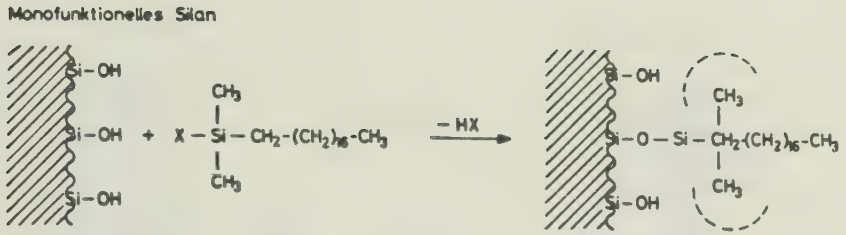


Abbildung 2: Modifizierung eines Silicagels mit einem monofunktionellen Silan

Ein difunktionelles Silan kann entweder wie ein monofunktionelles nur über eine Siloxanbrücke an das Kieselgelgerüst gebunden werden, oder aber bei der Reaktion beider X-Gruppen über zwei Brücken (Abbildung 3). Falls das Silan nur über eine Brücke gebunden wird, wird die verbleibende reaktive Gruppe unter Entstehung einer Silanolgruppe hydrolisiert. Der Bindungsgrad von difunktionellen Silanen beträgt etwa 1.5 (66), d.h. eine Hälfte aller reagierenden Modifiermoleküle ist einzähnig, die andere Hälfte zweizähnig an das Kieselgelgerüst gebunden.

Trifunktionelle Silane reagieren ebenfalls zu ein- oder zweifach gebundenen Spezies (Abbildung 4). Eine Reaktion aller drei X-Gruppen des Silans ist aus sterischen Gründen äußerst unwahrscheinlich, da der mittlere Abstand zweier Silanolgruppen nur 0.50 nm beträgt (61).

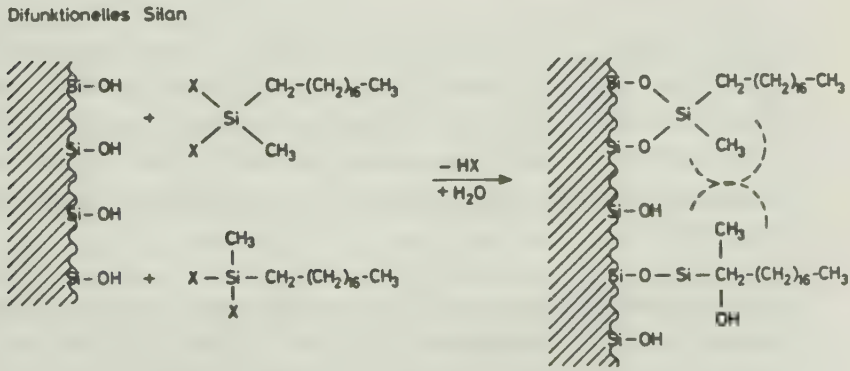


Abbildung 3: Modifizierung eines Silicagels mit einem difunktionellen Silan

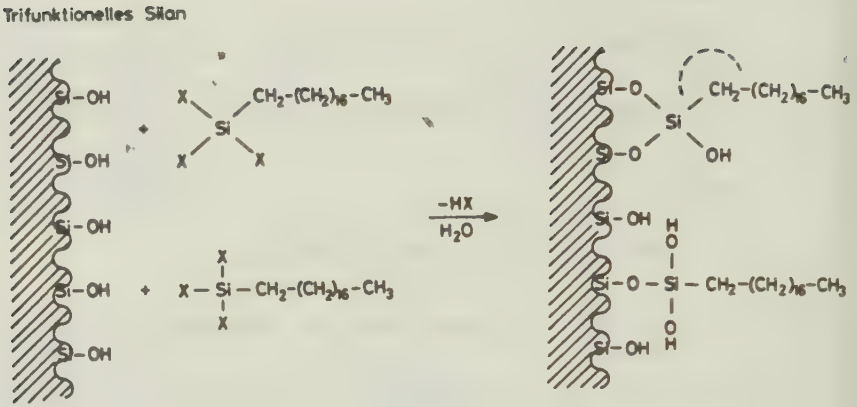


Abbildung 4: Modifizierung eines Silicagels mit einem trifunktionellen Silan

Wie aus den Schemata zu ersehen ist, wird bei Verwendung eines trifunktionellen Silans für jedes gebundene Silan mindestens eine neue Silanolgruppe gebildet, so daß nach der Modifizierung mehr Silanolgruppen vorhanden sind als vorher. Die zusätzlichen, durch Hydrolyse gebildeten Silanolgruppen können im Verlauf der Reaktion untereinander unter Ausbildung einer Siloxanbindung oder wie alle übrigen Silanolgruppen mit weiterem Silan aus der Lösung reagieren. Auf diese Weise ist die Gefahr der Bildung polymerer Phasen gegeben, die wegen ihrer schlechten Effizienz monomeren Phasen aus chromatographischer Sicht unterlegen sind.

Bei Verwendung von di- oder trifunktionellen Modifiern nimmt die Konzentration von Silanolgruppen also nicht ab, sondern bleibt gleich oder nimmt sogar zu (66). Deshalb muß die Phase nachbehandelt werden, da die polare Wechselwirkung mit Silanolgruppen in der RP-Chromatographie unerwünscht ist. Nach Möglichkeit sollten alle Silanolgruppen während des chromatographischen Trennprozesses für Probensubstanzen unzugänglich sein.

Die Nachbehandlung ("endcapping") führt man mit Trimethylchlorsilan, Hexamethyldisilazan (HMDS) oder Mischungen beider Agenzien durch. Die kleinen und somit sterisch wenig gehinderten Trimethylsilanreste reagieren mit allen ihnen zugänglichen Silanolgruppen, also sowohl an Oberflächensilanolgruppen als auch an den durch Hydrolyse entstandenen (Abbildung 5).

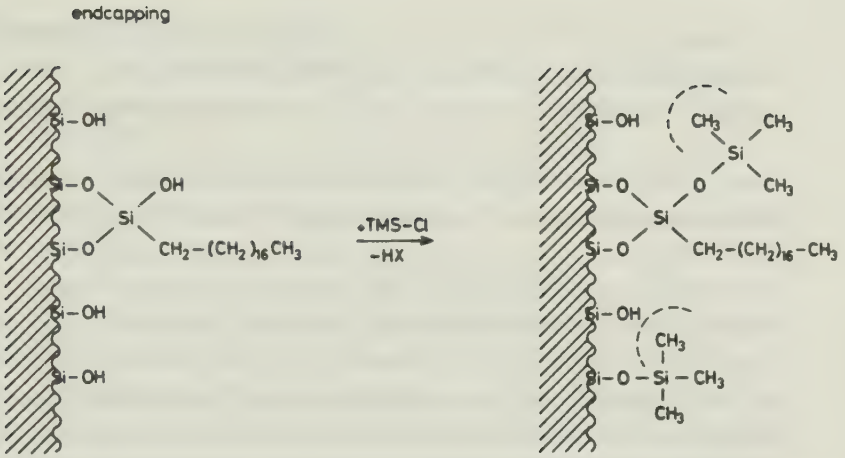


Abbildung 5: "endcapping"

2.1.3.3. Darstellung von RP-18 Phasen

Es gibt in der Literatur zahlreiche Vorschriften für die Herstellung von RP-18- oder ODS-Phasen (66-75). Allen ist gemeinsam, daß das Basissilicagel im Vakuum auf 120 bis 250 °C erhitzt wird, um physisorbiertes Wasser von der Oberfläche des Silicagels zu entfernen. Das so vorbehandelte Silicagel wird unter Wasserausschluß entweder im flüssigen Modifier oder mit dem Modifier in einem inerten, hochsiedenden Lösungsmittel wie Toluol oder Trichlorbenzol suspendiert. Die Reaktionsdauer unter Rückflußbedingungen schwankt zwischen 4 und 48 Stunden.

Es wird heute allgemein akzeptiert, daß die Herstellung von RP-Phasen mit monofunktionellen Modifiern Vorteile gegenüber der Verwendung von di- oder trifunktionellen Silanen bei der Synthese bringt. Frühere Aussagen, nach denen die Beladung der RP-Phase bei der Reaktion mit einem trifunktionellen Silan höher sei, konnten nicht bestätigt werden. Im Gegenteil werden heute bei Anwendung von geeigneten Reaktionsbedingungen höhere monomere Beladungen mit monofunktionellen Silanen erzielt. Für die Verwendung monofunktioneller Silane spricht die eindeutige

Reaktionsweise und damit die Herstellung definierter Spezies auf der Oberfläche des Silicagels. Die Gefahr der Bildung von polymeren Schichten und der Zwang, wegen zusätzlich entstandener Silanolgruppen mit Trimethylchlorsilan nachzusilylieren, entfällt.

Neben der Funktionalität spielt auch die Wahl der reaktiven Gruppe für die erreichbare Beladung eine Rolle. Neben Chlorsilanen wurden u.a. Alkoxysilane (z.B. Methoxysilan oder Ethoxysilan) und N,N-Dimethylaminosilan (74) vorgeschlagen. In einer Untersuchung über die Reaktivität der verschiedenen reaktiven Gruppen konnte festgestellt werden, daß mit N,N-Dimethylaminosilan die höchsten Beladungen erzielt werden, gefolgt von Chlorsilanen und Methoxysilanen (76). Andererseits ist die Reaktion mit Methoxysilanen unter sehr milden Bedingungen durchführbar und hinterläßt als Reaktionsprodukt lediglich Methanol. Mit N,N-Dimethylaminosilan und Chlorsilan entstehen N,N-Dimethylamin bzw. Salzsäure, die sich nicht immer einfach aus der Phase auswaschen lassen.

2.2. ELEMENTARANALYSE UND BET-OBERFLÄCHENBESTIMMUNG

Bei der Modifizierung von Silicagel zu einer RP-Phase wird ein organischer Ligand auf das Basismaterial aufgepfropft. Aus der Auswertung der CH-Analyse erhält man daher Aussagen über den Grad der Umsetzung. Der Kohlenstoffgehalt ergibt nach Formel 2 die molare Menge von auf der Phase gebundenem Alkylliganden l:

$$2) \quad l = \frac{\%\,C}{12 * N * 100} \text{ mmol Ligand}$$

mit % C = Kohlenstoffgehalt der modifizierten Phase
N = Anzahl der Kohlenstoffatome pro Ligand

Die Silicagele, die in der Chromatographie derzeit Verwendung finden, haben als hochporöse Materialien Oberflächen von mehreren hundert Quadratmetern, bezogen auf ein Gramm Silicagel. Zur Bestimmung der Oberfläche wird meist die Stickstoffadsorption nach der Methode von Brunauer, Emmett und Teller (BET-Messung) verwendet. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode wird mit ±5% angegeben (77).In Tabelle 1 sind die Ergebnisse von BET-Messungen verschiedener, in dieser Arbeit verwendeter Silicagele wiedergeben.

Selbst bei sorgfältiger Kontrolle des Herstellungsprozesses ist die Reproduzierbarkeit der BET-Oberfläche von Batch zu Batch Schwankungen von ± 10 % unterworfen. Die von Herstellern in Katalogen und Firmenschriften angegebenen Spezifikationswerte für die BET-Oberfläche differieren nicht selten um 20 % vom wahren Wert. Für die Darstellung von RP-Phasen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Batches des gleichen Silicagels verwendet. Nach Herstellerangaben sollten beide Materialien eine BET-Oberfläche von 350 m^2/g aufweisen, doch die BET-Messung ergab für Batch I eine BET-Oberfläche von 410 m^2/g, für Batch II eine von 345 m^2/g. Die Abweichungen von der Firmenspezifikation betragen in einem Fall 17 %.

Tabelle 1: BET-Messungen an unmodifizierten und modifizierten Silicagelen

Phase	Oberfläche in m^2/g	Firmenspezifikation m^2/g (Lit.)
Nucleosil 7-100 (I)	410	350 (78)
Nucleosil 7-100 (II)	345	350 (78)
Hypersil	179	180 (79)
LAB II	310	-
LAB V	205	-

Da die BET-Oberfläche in die Berechnung vieler Phasendaten mit eingeht, kommt der genauen Bestimmung eine große Bedeutung zu. Fehler von 20 % machen jedoch eine Berechnung sinnlos, da Werte mit solch großen Unsicherheiten keinerlei Interpretation mehr zulassen. Für den Vergleich von Phasen, die aus unterschiedlichen Batches von Silicagelen hergestellt wurden, ist deshalb für jedes Batch einzeln eine BET-Bestimmung durchzuführen.

Mit dem Kohlenstoffgehalt und der BET-Oberfläche des Basissilicagels läßt sich nach Formel 3 der Bedeckungsgrad ∂ errechnen:

$$3a) \quad \partial = \frac{\%C * 1000000}{BET\left(1200 * N * \frac{(1 - \%C * MG)}{1200 * N}\right)} \quad \mu mol/m2$$

mit MG = Molekulargewicht des Liganden
BET = BET-Oberfläche des Ausgangssilicagels

Bei Verwendung eines monofunktionellen Octadecyldimethylsilans (ODS) ist N = 20. Formel 3a vereinfacht sich zu:

$$3b) \quad \partial = \frac{\%C * 1000000}{BET\,(24000 - \%C * MG)} \quad \mu mol/m^2$$

Abbildung 6 zeigt die nach Formel 3b berechnete Oberflächenbedeckung als Funktion des Kohlenstoffgehalts der Phase bzw. der absoluten Menge an ODS. Die Daten sind berechnet für die monofunktionelle Modifizierung von Silicagelen mit 100, 200, 300 und 400 m^2/g Oberfläche zu einer Octadecylphase. Aus dieser Abbildung kann man den zu erwartenden Kohlenstoffgehalt bei maximaler Beladung abschätzen. Um z.B. eine Beladung von 4 $\mu mol/m^2$ zu erhalten, müssen auf einem Silicagel mit 100 m^2 BET-Oberfläche nur 8.5 % Kohlenstoff oder 0.35 mmol ODS gebunden werden, während die gleiche Beladung bei einem Silicagel mit 400 m^2 Oberfläche mehr als 25 % Kohlenstoff oder 1.1 mmol ODS ergibt. Daraus folgt, daß aus der Kohlenstoffbeladung einer kommerziellen Phase keine exakte Aussage über die Beladung gemacht werden kann, da normalerweise die genauen BET-Oberflächen nicht in Erfahrung zu bringen sind.

Der einem Liganden zur Verfügung stehende Platz an der Oberfläche des Silicagels läßt sich nach Formel 4 (80) berechnen:

$$4) \quad P = \frac{10}{\partial * N_L} \quad nm^2/Kette$$

mit $N_L = 6.023 * 10^{23}$

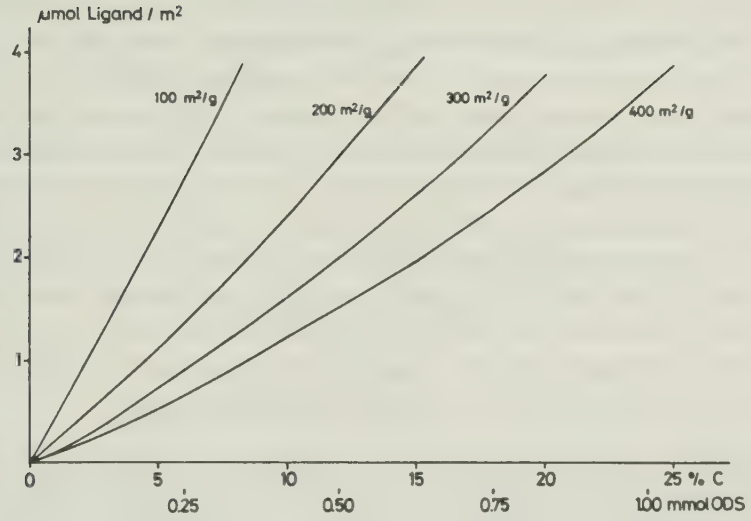


Abbildung 6: Beladung ∂ als Funktion der Kohlenstoffgehalts bzw. der Menge an gebundenem ODS und der BET-Oberfläche des Basissilicagels

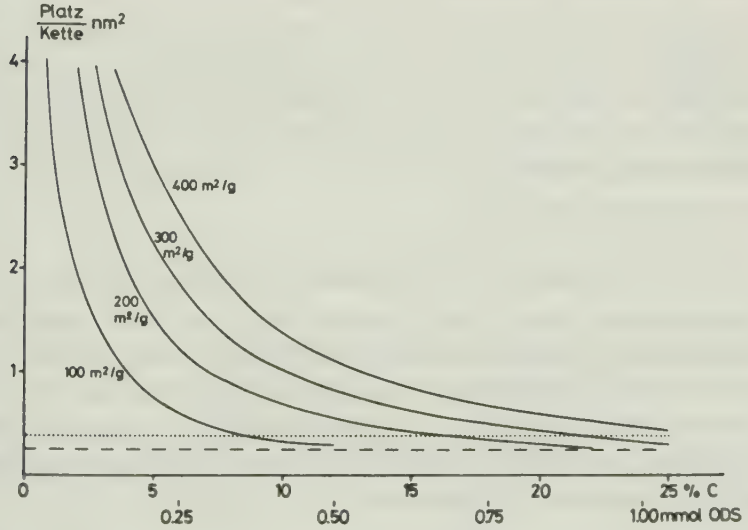


Abbildung 7: Platz pro Kette als Funktion der Beladung bzw. der Menge an gebundenem ODS und der BET-Oberfläche des Basissilicagels

Die Dimensionen einer Alkylkette sind aus Bindungslängen und -winkeln berechenbar sowie über röntgenographische (81-84) Daten oder Messungen mit der Langmuirwaage (85) bestimmbar. Beschreibt man die räumliche Anordnung einer Alkylkette als Zylinder, so sind die Länge l und der Zylinderquerschnitt q zu einer Charakterisierung ihrer Größe ausreichend. Aus einen Bindungsabstand von 154 pm für eine C-C-Bindung und 109 pm für ein C-H-Bindung sowie dem Tetraederwinkel von 109.5° errechnet man für eine Octadecylkette eine Länge von 231.4 pm und einen Querschnitt von 0.233 nm^2. Diese Werte stimmen mit den röntgenographischen Werten, die von Müller mit 233 pm für die Länge und 0.192 nm^2 für den Durchmesser einer Octadecylkette bestimmt wurden, recht gut überein, wenn man bedenkt, daß sich diese Werte auf Festkörper beziehen (81,82). In der Nähe des Schmelzpunktes erhöht sich der Querschnitt um etwa 0.02 nm^2 auf 0.21 nm^2, im flüssigen Zustand um weitere 0.01 nm^2 auf etwa 0.22 nm^2 (83).

Die Messungen von Langmuir an monomolekularen Schichten von langkettigen Alkylderivaten ergeben einen Querschnitt, d.h. molekularen Platzbedarf, von 0.21 bis 0.27 nm^2 für langkettige, unverzweigte Alkanderivate (85). In den folgenden Betrachtungen wird von einem Platzbedarf von 0.25 nm^2 für eine Alkylkette ausgegangen.

Bei dieser Betrachtung ist zwischen dem Platzbedarf, der sich aus der molekularen Ausdehnung eines Moleküls ergibt, und dem, einem Molekül im Mittel zur Verfügung stehenden Platz zu unterscheiden. Letzterer errechnet sich nach Formel 4 aus der Anzahl der Moleküle pro Fläche und ist ein Maß für die Bewegungsfreiheit eines Moleküls. Der molekulare Platzbedarf markiert die unterste Grenze für den von einem Molekül beanspruchten Platz, da Moleküle nicht dichter als bis zur Berührung ihrer van-der-Waals-Radien gepackt werden können.

In Abbildung 7, die wiederum bei verschiedenen BET-Oberflächen den einer Kette zur Verfügung stehenden Platz als Funktion des Kohlenstoffgehalts bzw. der absoluten Zahl an ODS der stationären Phase zeigt, ist diese Grenze durch die untere, gestrichelte Linie verdeutlicht. In der Literatur finden sich Angaben über einen Platzbedarf von 0.6 - 0.8 nm^2 pro Alkylkette (67,86). Richtiger ist, von dem einer Alkylkette zur Verfügung stehenden Platz oder einer Packungsdichte zu sprechen, da sich diese Größe aus der Anzahl der Alkylketten pro Fläche errechnet.

Da die Alkylketten bei monofunktionellen Modifiern über einen Dimethylsilylrest an die Oberfläche des Silicagels gebunden werden, erhöht sich der Platzbedarf an der

Bindungsstelle auf 0.37 nm^2 pro gebundene Alkylkette (gepunktete Linie in Abbildung 7) (87). Der Schnittpunkt der Kurven mit der gepunkteten Linie markiert den für eine BET-Oberfläche maximalen Kohlenstoffgehalt.

Aus dem Platzbedarf von 0.37 nm^2 pro gebundene Kette errechnet man eine maximale Bedeckung von 4.5 $\mu mol/m^2$, was auch experimentell bestätigt werden konnte (74).

Die Anzahl der Silanolgruppen ist rechnerisch nach Formel 5 bestimmbar:

$$5) \quad S = \frac{4.8 * BET * (1 - 1 * MG) * 10^{14}}{N_L} \quad mmol/g$$

Der Faktor 4.8 repräsentiert die mittlere Anzahl von Silanolgruppen je nm^2 und wurde unter Annahme einer Silanolgruppendichte von 8 $\mu mol/m^2$ bestimmt. Der Platzbedarf einer Silanolgruppe beträgt somit 0.217 nm^2 - dies entspricht einem mittleren Abstand von 0.5 nm zwischen zwei Silanolgruppen. In Abbildung 8 ist die mit Formel 5 berechnete Anzahl an Silanolgruppen bei verschiedenen BET-Oberflächen als Funktion der Beladung zu sehen. Die abolute Zahl an Silanolgruppen pro Gramm modifizierte Phase nimmt linear mit der Beladung mit ODS ab.

Die Anzahl der Silanolgruppen ist spektroskopisch durch einen Deuteriumaustausch mit CF_3COOD (88) bestimmbar. Von zwei nicht modifizierten Silicagelen verschiedener Hersteller (Nucleosil und Hypersil) und drei auf der Basis von Nucleosil modifizierten Phasen wurden jeweils die Gesamtkonzentration an Silanolgruppen bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Konzentration an Silanolgruppen nach der CF_3COOD-Methode

Phase	BET-Oberfläche (m^2/g)	S ($\mu mol/m^2$)
Hypersil	180	7.2
Nucleosil	345	8.3
LAB II	310	7.1
LAB III	-	6.2
LAB V	205	5.9

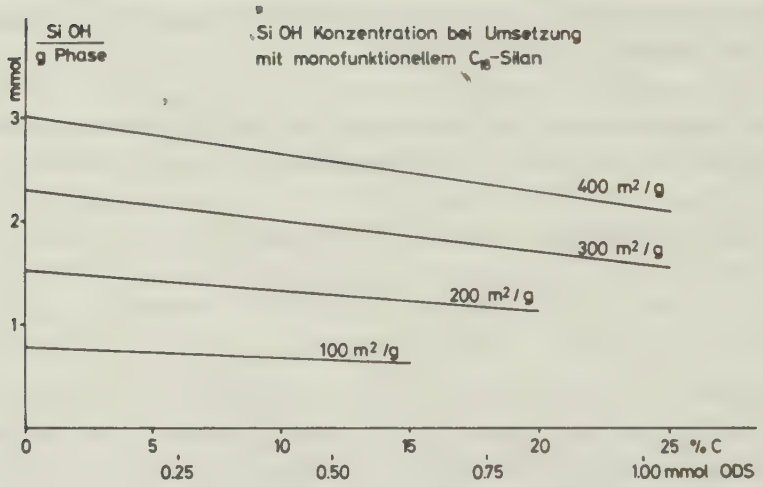


Abbildung 8: Konzentration an Silanolgruppen als Funktion des Kohlenstoffgehalts bzw. der Menge an gebundenem ODS und der BET-Oberfläche des Basissilicagels

Diese Messungen zeigen einmal einen Unterschied in der Silanolgruppenkonzentration der Basismaterialien und zum anderen die Abnahme der Silanolgruppen bei der Modifizierung.

Aus dem Platzbedarf von Alkylkette und Silanolgruppe kann man errechnen, daß aus Platzgründen lediglich 55 % aller Silanolgruppen reagieren können. Die restlichen 45 % Silanolgruppen werden größtenteils durch die Alkylgruppen abgeschirmt. Im Gegensatz zu den Alkylgruppen, die mit Probenmolekülen nur über die auf kurze Distanzen wirkenden van-der-Waals-Kräfte wechselwirken können, sind Silanolgruppen zu den weiterreichenden ionischen Bindungen oder Wasserstoffbrückenbindungen befähigt. Somit ist erklärbar, daß Silanolgruppen, obwohl sie chemisch nicht mehr zugänglich sind, dennoch eine aktive Rolle im Trennmechanismus übernehmen können.

2.3. SPEKTROSKOPISCHE VERFAHREN

Zur Untersuchung der Spezies an der Oberfläche von Silicagelphasen werden sowohl chemische als auch physikalische Verfahren angewandt. Unter den spektrokopischen Methoden ist die IR-Spektroskopie sowohl im Bereich der Grundschwingungen der Silanolgruppen (4000 - 2000 cm^{-1}), im Bereich der Oberschwingungen (8000 - 4000 cm^{-1}) als auch im nahen IR sehr nützlich zur Identifizierung und Quantifizierung der verschiedenen Silanolspezies (89-92). Neben der Transmissionsspektroskopie kommen auch verschiedene Varianten wie Reflektionsspektroskopie und Photoakustische IR-Spektroskopie (IR-PAS) zur Anwendung (93), teilweise in Verbindung mit Fourier-Transform-Techniken.

Während die IR-Spektroskopie vor allem zur Charakterisierung von nicht modifiziertem Silicagel bzw. zur Kontrolle der Umsetzung über die Quantifizierung der Silanolgruppen dient, müssen zur Charakterisierung der aufgepfropften Modifier andere Methoden angewandt werden.

Falls das Silicagel durch die Modifikation Liganden mit fluoreszierenden Gruppen trägt, sind mit der Fluoreszenzspektroskopie Aussagen über die Entfernung zweier Liganden und damit ihrer Wechselwirkung untereinander möglich (94,95). Durch ESCA und Augerspektroskopie sind über das Verhältnis Si/C und Si/O genaue Aussagen über den Grad der Beladung und die verbleibende Silanolgruppenkonzentration möglich (93).

Die Charakterisierung der aufgepfropften Liganden ist durch eine hydrolytische Spaltung der Si-C-Bindung mit anschließender GC-MS-Analyse oder eine direkte Pyrolyse mit GC-MS möglich. Der Nachteil dieser Methoden, die sowohl eine genaue Charakterisierung wie auch Quantifizierung erlauben, ist die Zerstörung der Probe bei der Analyse.

Neben den genannten spektroskopischen Methoden ist in letzter Zeit die Bedeutung der NMR-Spektroskopie sowohl zur Charakterisierung als auch zur Untersuchung des dynamischen Verhaltens der Oberflächenspezies von modifizierten Silicagelen gewachsen (40-53).

2.3.1. Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die ^{29}Si- und ^{13}C-Festkörper-NMR-Spektroskopie erlaubt die zerstörungsfreie Untersuchung der Oberflächenstruktur chemisch gebundener Silicagelphasen. Die im Festkörper auftretende Linienverbreiterung der einzelnen Signale durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und die Anisotropie der chemischen Verschiebung können durch eine schnelle Rotation (3 - 5 Hz) um den magischen Winkel von 54° 44 min (MAS = magic angle spinning) ausgemittelt werden. Durch eine kombinierte Anwendung von dipolarer Entkopplung und Kreuzpolarisation (CP = cross polarisation) werden die langen Relaxationszeiten im Festkörper verkürzt. Da die Effizienz der Kreuzpolarisation vom Si-H-Abstand abhängt, werden nur Siliziumatome an der Oberfläche der Phase erfaßt, während die inneren Gerüstsiliziumatome keinen Einfluß auf die Spektren zeigen. Die gleichzeitige Anwendung von Kreuzpolarisation und Rotation um den magischen Winkel (CP-MAS-NMR-Spektroskopie) erlaubt die Aufnahme von Spektren, die unter bestimmten Bedingungen die gleiche Auflösung wie NMR-Lösungsspektren aufweisen.

In Abbildung 1 sind die auf der Oberfläche von nicht modifiziertem Silicagel vorhandenen Arten von Silanolgruppen und Siloxanbrücken dargestellt. Außer den Strukturelementen des Basissilicagels können die durch die Modifizierung entstandenen Spezies (siehe Abbildungen 2 bis 5) auf der Oberfläche der RP-Phase vorhanden sein. In Abbildung 9 a ist das ^{29}Si-CP-MAS-NMR-Spektrum einer mit einem monofunktionellen Silan hergestellten RP-Phase gezeigt. Die Signale bei -109 ppm und -100 ppm stammen dabei von vierfach mit Sauerstoff koordinierten Siliziumatomen des Basissilicagels. Das Signal bei -109 ppm rührt von einem Gerüstsilizium, das bei -100 ppm von einem Oberflächensilizium, das eine Hydroxylgruppe trägt (Si-OH). Die Schulter bei -91 ppm ist geminalen Silanolgruppen ($Si(OH)_2$) zuzuordnen. Die gegenüber unmodifiziertem Silicagel zusätzliche Resonanz bei +18 ppm weist auf ein Strukturelement eines dreifach mit Kohlenstoff und einfach mit Sauerstoff koordinierten Siliziums hin und stammt vom eingeführten Silan des Modifiers.

Wird zur Modifizierung ein difunktionelles Silan verwendet (Abbildung 3), sind als zusätzliche Strukturelemente zweifach mit Sauerstoff und zweifach mit Kohlenstoff substituierte Siliziumatome möglich. Das Signal bei -9.9 ppm in Abbildung 9b kann dem einzähnig gebundenen Silan, das bei -18.2 ppm dem zweizähnig an die Oberfläche gebundenen Silan zugeordnet werden. In diesem ^{29}Si-Spektrum, das von einer Probe

Lichrosorb RP 18 stammt, findet sich bei +15 ppm kein Signal, ein Zeichen dafür, daß diese Phase keiner Nachbehandlung mit einem Trimethylsilan unterworfen wurde.

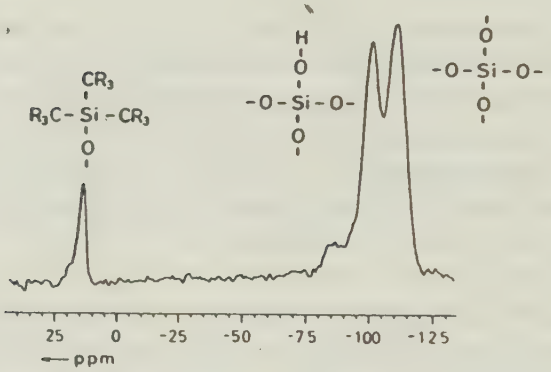
Stationäre RP-Phasen aus Silicagelen und trifunktionellen Modifiern (Abbildung 4) weisen Signale bei -48 ppm (einzähnig mit zwei freien Hydroxy- oder Alkoxygruppen gebundenes Silan), -57 ppm (zweizähnig gebundene oder dimerisierte Silane mit einer freien Hydroxy- oder Alkoxygruppe) und -66 ppm auf (einzähnig gebundene Silane, die aber durch endcapping oder Quervernetzung keine freien Hydroxy- und Alkoxygruppen tragen). Daß diese Phase mit einem Trimethylsilan nachbehandelt wurde, ist an der Resonanz bei +12 ppm sichtbar (Abbildung 9 c).

Mit Hilfe der ^{29}Si-CP-MAS-NMR-Spektren sind also Aussagen über den Bindungszustand des eingeführten Siliziumatoms und damit über die Funktionalität des verwendeten Modifiers, das Ausmaß der Polymerisierung des verwendeten Silans und eventuelles endcapping möglich.

Die ^{13}C-CP-MAS-NMR-Spektren (Abbildung 9 d) erlauben Aussagen über die Struktur des gebundenen Modifiers. Mit Hilfe dieser Technik ist eine Unterscheidung zwischen z.B. Octadecyl-, Octyl-, Diol- und Aminopropylkieselgelen möglich. Da in dieser Arbeit ausschließlich ODS-modifizierte Silicagele verwendete wurden, wird an dieser Stelle nur auf das ^{13}C-CP-MAS-NMR-Spektrum einer ODS-Phase eingegangen.

Das Hauptsignal bei +30 ppm ist dem mittleren Teil der ODS-Kette mit den Kohlenstoffatomen C4 bis C15 zuzuordnen. Die Signale dieser Kohlenstoffatome sind wegen der gleichen chemischen Verschiebung nicht aufgelöst. Die Kohlenstoffatome C3 und C16 absorbieren bei +33.3 und +31.8 ppm, C2 und C17 bei +22.8 und +22.3 ppm und C1 und C18 bei +17.4 und +14.4 ppm. Die Resonanzen der Kohlenstoffatome, die sich nahe der Oberfläche befinden (C1 bis C3) sind wegen ihrer verringerten Beweglichkeit sehr breit und fallen dadurch teilweise mit den Resonanzen von C16 bis C18 zusammen.

ODS-Phase mit monofunktionellem Silan



ODS-Phase mit difunktionellem Silan

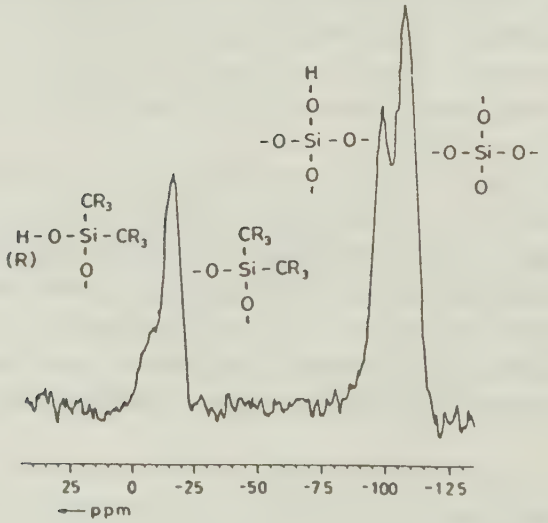


Abbildung 9: ^{29}Si-CP-MAS-NMR-Spektrum einer mit einem monofunktionellen (a) und difunktionellen (b) Silan hergestellten ODS-Phase

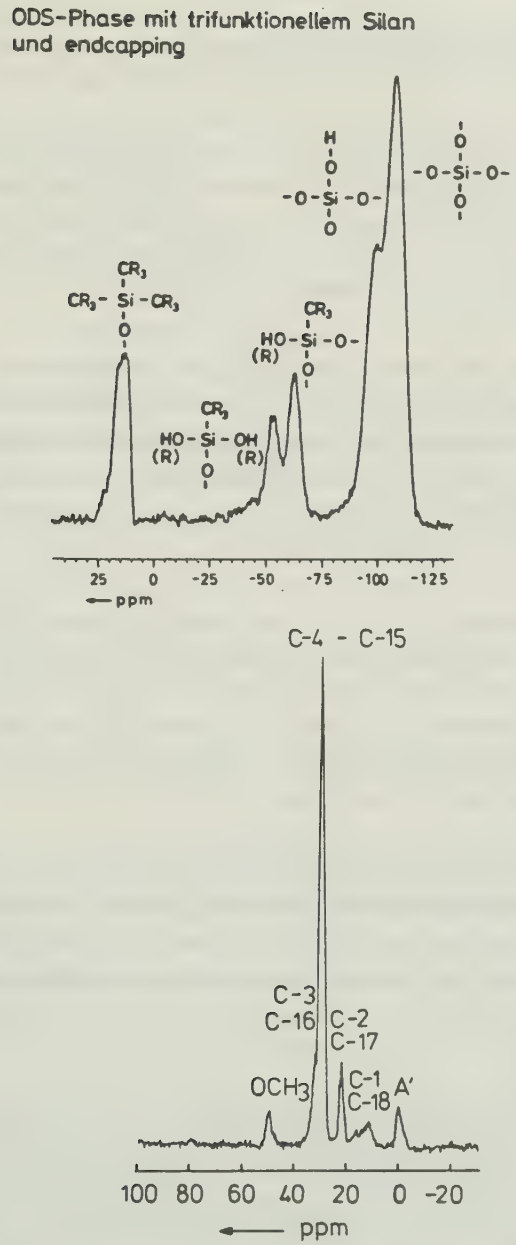


Abbildung 9: ^{29}Si-(c) und ^{13}C-CP-MAS-NMR-Spektrum (d) einer mit einem trifunktionellen Silan hergestellten ODS-Phase

2.4. CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN

Neben den Methoden der Oberflächenanalytik, wie sie in Kapitel 2.2. und 2.3. beschrieben wurden, erlauben auch chromatographische Tests Rückschlüsse auf Struktur und Verhalten der stationären Phase. Jedoch muß man sich bewußt sein, daß die Aussagen aus spektroskopischen Experimenten anderer Natur sind als die, die aus Chromatogrammen erhalten werden.

Bei spektroskopischen Experimenten sowie BET-Oberflächenbestimmung und CH-Analyse werden Eigenschaften der stationären Phase ohne Kontakt mit der mobilen Phase bestimmt. Die mit der jeweiligen Methode meßbaren Spezies werden quantitativ erfaßt, unabhängig von ihrer Zugänglichkeit oder Reaktivität in einem chromatographischen Experiment. Es ist daher nicht vorhersehbar, inwieweit eine spektroskopisch bestimmte Oberflächenspezies bei einer Trennung mitwirkt.

Andererseits ist der Rückschluß vom chromatographischen Verhalten einer Substanz oder eines Substanzgemischs auf die Struktur der stationären Phase mehr oder weniger spekulativ, sofern er nicht spektroskopisch untermauert werden kann. Chromatographie als indirektes und Spektroskopie als direktes Verfahren sind also sich ergänzende Methoden zur Oberflächenanalytik stationärer Phasen, wobei erst deren gemeinsame Beschreibung der Wirklichkeit sehr nahe kommt.

Ein Chromatogramm stellt die Summe von Meßsignalen als Funktion der Zeit dar. Diese Rohdaten müssen jedoch auf einfache Parameter reduziert werden, um Aussagen über die Größe der Retention einer Substanz, die Güte der Trennung eines Stoffgemischs oder die Qualität und Art der stationären Phase zu erhalten. Die Bestimmung dieser Parameter und ihre Beziehungen untereinander sind in den Monographien über HPLC ausführlich beschrieben (9-13).

Legt man eine Gaußverteilung der Peakform in einem Chromatogramm zugrunde, so könnte das Elutionsvolumen am Peakmaximum als qualitative Charakterisierung einer Substanz verwendet werden. Anstelle des Volumens wird häufig jedoch die Zeit des Peakmaximums angegeben, da beide Größen über die konstante Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase miteinander verknüpft sind und die Zeit direkt vom Schreiberprotokoll ablesbar ist.

Um jedoch die Retentionswerte bei verschiedenen Säulenlängen, Säulendurchmessern und Fließgeschwindigkeiten der mobilen Phase miteinander vergleichen zu können, wurde der sogenannte Kapazitätsfaktor oder "k'-Wert" definiert als:

$$6) \quad k' = \frac{V_r - V_o}{V_o} \qquad \text{bzw.} \qquad k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

wobei sich V_r bzw. t_r auf die Bruttoretention einer Substanz bezieht und V_o bzw. t_o die Menge an mobiler Phase in der Säule angibt.

Der k'-Wert gibt die Nettoretention einer Substanz wieder und ist unabhängig von apparativen Parametern. Er ist damit proportional zur Adsorptions- bzw. Verteilungskonstante K_x einer Substanz im gegebenen System. Der Proportionalitätsfaktor ist das Phasenverhältnis Ø, der Anteil an Oberfläche bzw. Volumen an stationärer Phase zu Volumen mobiler Phase in der Säule.

$$7) \quad k' = Ø * K_x$$

Für mehrere Trennmechanismen gilt:

$$8) \quad k' = \Sigma \, Øx * \frac{K_x}{V_m} = \Sigma \, Csx * Kx$$

wobei C_{sx} für den jeweiligen Trennmechanismus die Kapazität der stationären Phase darstellt und V_m das Volumen der mobilen Phase. Betrachtet man den Prozeß der Wechselwirkung einer Substanz mit der stationären Phase unter thermodynamischen Gesichtspunkten (18), so kann man schreiben:

$$9) \quad \ln k' = \ln Ø - \Delta G^\circ/RT$$

wobei ΔG° die freie Enthalpie der Wechselwirkung zwischen der stationären Phase und dem Probenmolekül angibt. R ist die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Auf diese Weise ist der k'-Wert mit thermodynamischen Parametern verknüpft und damit der Zusammenhang zwischen einer theoretischen Beschreibung des Trennprozesses im Rahmen der Thermodynamik und einer experimentellen Überprüfung durch die Ermittlung von k'-Werten gegeben.

2.4.1. Bestimmung des Totvolumens und der Totzeit bei RP-Phasen

Sowohl zur Überprüfung eines theoretischen Modells des chromatographischen Trennprozesses wie auch zum Vergleich von Trenndaten, die mit verschiedenen Trennsystemen oder unter verschiedenen apparativen Randbedingungen ermittelt wurden, ist eine möglichst genaue Bestimmung des k'-Wertes notwendig.

Dies hängt jedoch, wie die Definition zeigt, in entscheidender Weise von der Genauigkeit und Richtigkeit der Bestimmung des Volumens der mobilen Phase ab. In Abbildung 10 ist der Fehler in der Bestimmung des k'-Wertes gegen die gemessene Bruttoretentionszeit aufgetragen. In diesem Beispiel wurde davon ausgegangen, daß der "wahre" Wert für die Totzeit 1.50 min beträgt. Die mit dieser Totzeit ermittelten k'-Werte von 1.6 bis 30 min Bruttoretention bildeten die Referenz für diejenigen k'-Werte, die mit Totzeiten von 1.45 min, 1.40 min, 1.35 min und 1.30 min errechnet wurden. Obwohl die Abweichungen in der Totzeitbestimmung nur zwischen 4 und 14 % liegen, sind die Fehler für die k'-Werte vor allem bei kleinen Bruttoretentionen sehr hoch. Abbildung 10 verdeutlicht, wie wichtig eine exakte Bestimmung des Totvolumens bzw. der Totzeit eines chromatographischen Systems ist, wenn die daraus ermittelten Daten mit Daten anderer Herkunft verglichen werden oder zur Überprüfung eines theoretischen Modells dienen sollen.

Das Totvolumen V_0 bezeichnet die Menge an mobiler Phase in der Säule, die Totzeit t_0 die Meßgröße für V_0, die zwischen Injektion und Detektion einer Substanz vergeht, die mit der gleichen Geschwindigkeit wie die mobile Phase durch die Säule wandert. Wird die Totzeit durch die Wanderungsgeschwindigkeit einer Substanz bestimmt, so darf diese einerseits keine Retention an der stationären Phase zeigen und muß andererseits Zugang zu allen Poren haben, die auch von der mobilen Phase erreicht werden, d.h. sie darf nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu der Situation in der Gaschromatographie und der Adsorptionschromatographie mit polaren stationären Phasen gibt es in der reversed-phase-Chromatographie keine allgemein anerkannte Methode zur Bestimmung des Totvolumens. In der RP-Chromatographie ist, anders als in der Gaschromatographie oder der Adsorptions- chromatographie, die Struktur der stationären Phase eine Funktion der mobilen Phase (96). Die an Silicagel gebundenen Alkylliganden können je nach Polarität der mobilen Phase auf molekularer Ebene mehr oder weniger quellen und damit das

Volumen bzw. die Oberfläche der stationären Phase verändern. Damit geht jedoch ebenfalls eine Veränderung des Volumens der mobilen Phase einher.

Die Diskussion über die exakte Bestimmung des Totvolumens, die seit der Einführung der RP-Phasen vor über 10 Jahren in der Literatur geführt wird, ist eigentlich eine Diskussion über den zugrunde liegenden Trennmechanismus in der RP-Chromatographie und die Frage, wie stationäre und mobile Phase hier definiert werden.

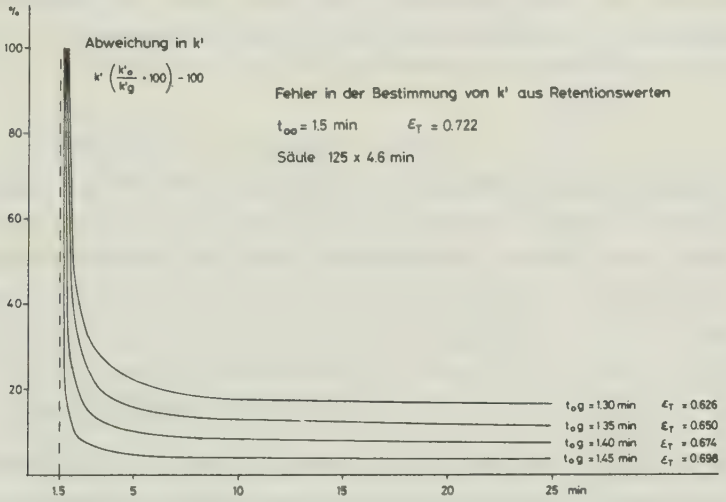


Abbildung 10: Fehler in der Bestimmung der k´-Werte bei falschem t_o

Zur Abschätzung der Totzeit ist die Porosität e_T oder der freie Querschnitt der Säule, der der mobilen Phase zur Verfügung steht, ein nützlicher Parameter. e_T ist definiert als (97):

$$10) \quad e_T = \frac{F * t_o}{L * r^2 * \pi}$$

mit F = Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase in ml/min
L = Länge der Säule in cm
r = Radius der Säule in cm

$$0.42 < e_T < 0.84$$

Die Extremwerte, die e_T annehmen kann, sind 0.42 bei vollkommen undurchlässigen, d.h. nicht porösen Teilchen und 0.84 bei vollkommen porösen Teilchen in der Säule. Mit Hilfe von e_T kann man bei bekannten Säulendimensionen und Fließgeschwindigkeiten abschätzen, in welchem Zeitintervall die Totzeit liegen muß. Ist e_T für das Meßsignal einer Substanz größer als 0.84, wurde diese Substanz sicher an der stationären Phase retardiert, ist e_T kleiner als 0.42, sicher ausgeschlossen. In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung der Totzeit Säulen von 125 mm Länge und 4.6 mm Innendurchmesser verwendet. Die nominale Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Damit ergibt sich ein Erwartungsbereich von 0.87 bis 1.75 min für die Totzeit.

In der Literatur wird eine Vielzahl von Meßmethoden zur Bestimmung von V_0 vorgeschlagen, die in statische (96), dynamische (98-108) und rechnerische (102,109-112) Verfahren eingeteilt werden können. Bei dem statischen Verfahren wird die Säule mit zwei Eluenten unterschiedlicher Dichte gefüllt und gewogen. Aus dem Gewichtsunterschied und der Dichtedifferenz läßt sich ein V_0 bestimmen, dessen Wert jedoch unabhängig von der Zusammensetzung der mobilen Phase ist und eine wechselseitige Beeinflussung von mobiler und stationärer Phase außer Acht läßt. Ein so ermitteltes V_0 ist das maximale V_0 einer Säule, was dazu führt, daß negative k'-Werte berechnet werden, falls zwischen den richtigen und maximalen V_0 Substanzen eluiert werden. Diese Methode ist keine chromatographische Methode, durch den Aus- und Wiedereinbau der Säule und das Wiegen relativ umständlich und zeitraubend und zudem von ihrer theoretischen Begründung her zweifelhaft. In dieser Arbeit wurde deshalb auf eine statische Bestimmung von V_0 verzichtet.

Unter den dynamischen Methoden versteht man chromatographische Methoden, die auf der Injektion von nicht retardierten und nicht ausgeschlossenen Substanzen beruhen. Vorgeschlagen werden Komponenten und isotopenmarkierte Komponenten der mobilen Phase (96,98-103) sowie anorganische (96,107) und organische Verbindungen (96,102-107), von denen behauptet wird, daß sie weder retardiert noch ausgeschlossen werden. Die mathematischen Methoden (102,109-112) beruhen auf einer Linearisierung der Retentionsdaten homologer Reihen.

Die Ergebnisse der in der Literatur vorgeschlagenen Methoden sind oft widersprüchlich oder haben nur einen begrenzten Gültigkeitsbereich. Für die Messung von V_o bzw. t_o an RP-Phasen mit unterschiedlicher Beladung bei variabler Fließmittelzusammensetzung sollten folgende Kriterien erfüllt sein:

Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Bestimmung des "richtigen" V_o bzw. t_o

Anwendbarkeit bei 0 - 100 % organische Komponente in der mobilen Phase

Anwendbarkeit bei RP-Phasen unterschiedlicher Beladung, d.h. unterschiedliches Verhältnis hydrophober und silanophiler Wechselwirkungen

chromatographisches Verfahren

Einsatz eines UV-Detektors

Ein wesentliches Problem stellt der Detektor des chromatographischen Systems dar. In Fällen, in denen die Retentionszeit von isotopenmarkierten Verbindungen oder nicht UV-aktiven homologen Reihen wie Alkanen, Alkylalkoholen oder -estern gemessen werden soll, ist ein RI-Detektor notwendig. In den meisten HPLC-Anlagen wird als Detektor jedoch wegen der größeren Empfindlichkeit ein UV-Detektor verwendet, RI-Detektoren sind eher selten und nicht in jedem Labor verfügbar.

Aber auch mit einem UV-Detektor sind unter bestimmten Umständen Signale von nicht UV-aktiven Substanzen zu erhalten. Deuterierte Komponenten der mobilen Phase wie D_2O, CD_3CN und CD_3OD ergeben in einem UV-Detektor ein Signal, das jedoch nicht proportional der Menge an deuterierter Verbindung und deshalb auch nicht quantitativ auswertbar ist.

Tabelle 3 zeigt die Brechungsindices der in der RP-Chromatographie eingesetzten Komponenten der mobilen Phase und ihrer deuterierten Analoga (113). Wie daraus zu ersehen ist, haben die deuterierten Verbindungen andere Brechungsindices als nicht deuterierte bzw. deren Mischung mit Wasser. Bei dem Paar H_2O/D_2O ist der Unterschied besonders groß.

Tabelle 3: Brechungsindices von RP-Eluenten und ihrer deuterierten Analoga

Verbindung	n_d	Verbindung	n_d
H_2O	1.3330	D_2O	1.3280
CH_3CN	1.3441	CD_3CN	1.3402
CH_3OH	1.3288	CD_3OD	1.3251
THF	1.4075	THF (d8)	1.4043

Abhängig von der Konstruktion der UV-Meßzelle und der absoluten Änderung des Brechungsindex beim Eintritt einer deuterierten Verbindung in die Meßzelle fällt mehr oder weniger Licht auf den Photomultiplier der Meßzelle als auf den der Referenzzelle. Das Signal zeigt daher zuerst eine positive und dann eine negative Adsorption bzw. umgekehrt. Abbildung 11 zeigt ein typisches RI-Signal mit einem zuerst positiven und dann negativen Ausschlag für D_2O und CD_3CN in einer mobilen Phase Wasser-Acetonitril (50:50, v/v), wie sie bei höchster Empfindlichkeit des UV-Detektors erhalten werden. Mit Hilfe eines RI-Detektors wurde die Richtigkeit der Signalzuordnung überprüft.

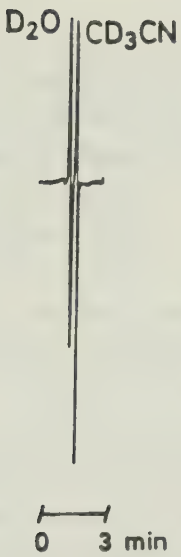


Abbildung 11: RI-Signal von D_2O und CD_3CN, aufgenommen mit einem UV-Detektor bei 254 nm

2.4.1.1. Bestimmung des Totvolumens und der Totzeit durch Totzeitmarker

In einer ersten Serie von Experimenten sollte untersucht werden, ob sich in der Literatur vorgeschlagene Substanzen über den gesamten Bereich von 100 bis 0 % organische Phase zur V_0-Bestimmung eignen und inwieweit die einzelnen Substanzen in der Bestimmung von V_0 übereinstimmen. Alle V_0-Bestimmungen dieser Serie wurden mit Hypersil ODS 5 µ als stationärer Phase in einer Säule der oben angegebenen Dimension durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit wurde in fünf aufeinderfolgenden Messungen mit Hilfe einer Stoppuhr und eines Meßzylinder bestimmt, der Mittelwert betrug 0.98 ± 0.01 ml/min. Jede Totzeitbestimmung wurde sechsmal wiederholt, aus den sechs Totzeiten wurde ein Mittelwert gebildet und dessen Standardabweichung bestimmt. Die Standardabweichung war in allen Fällen kleiner als 1.5 % und damit innerhalb des Fehlerintervalls der Flußkonstanz. Diese Säule wurde bei 25 ± 0.1 °C in einem Wasserbad thermostatisiert.

Als Probensubstanzen wurden D_2O als Isotop einer Komponente der mobilen Phase, Kaliumnitrat als Beispiel für ein anorganisches Salz mit einer UV-Adsorption bei 254 nm sowie Uracil und Thioharnstoff als nicht retardierte, organische Substanzen ausgewählt. D_2O wurde mit Acetonitril zu gleichen Teilen gemischt, von Kaliumnitrat wurde eine 0.05 m Lösung hergestellt, Uracil und Thioharnstoff jeweils zu 10 ng/ml gelöst. Da von jeder dieser vier Lösungen 10 µl aufgegeben wurden, gelangten an absoluten Mengen 5 µl D_2O, 50 µg KNO_3 und je 100 ng Uracil und Thioharnstoff auf die Säule. Vor allem bei anorganischen Salzen spielt die aufgegebene Menge eine große Rolle für die ermittelte Totzeit, da sich bei größeren Mengen das Peakmaximum zu längeren t_o-Werten verschiebt (96). Die injizierte Menge an anorganischem Salz sollte daher so gering als möglich sein, doch wird diese Menge von der Empfindlichkeit des Detektors begrenzt. 50 µg KNO_3 waren die geringste Menge, die bei hoher Empfindlichkeit des Detektors noch erfaßt werden konnten. Die Ergebnisse der t_o-Bestimmung sowie die e_T-Werte sind in Tabelle 4 und Abbildung 12 zusammengefaßt.

Aus den e_T-Werten der Tabelle 4 ist zu ersehen, daß zumindest Uracil bei 100 % Wasser und Thioharnstoff bei mehr als 70 % Wasseranteil in der mobilen Phase retardiert werden. Weiterhin wird deutlich, daß der mit Nitrat ermittelte t_o-Wert über den Bereich von 0 bis 100 % Acetonitril um mehr als 30 % schwankt, während sich höchster und niedrigster mit D_2O gemessener t_o-Wert um weniger als 10 % unterscheiden. Die mit D_2O in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der mobilen Phase ermittelte Kurve stimmt im wesentlichen mit den in der Literatur veröffentlichten Adsorptionsisothermen von D_2O in Acetonitril-Wasser-Gemischen (98-101) überein.

Da die Adsorption eines Probenmoleküls an die stationäre Phase eine Funktion der Temperatur ist, kann man durch die Wiederholung eines chromatographischen Experiments bei geänderter Temperatur feststellen, ob eine Substanz retardiert wird, obwohl die e_T-Werte innerhalb des für t_o-Werte möglichen Intervalls liegen. Aus diesem Grund wurden alle t_o-Bestimmungen wiederholt, wobei die Säule bei 50 °C thermostatisiert war. Tabelle 5 und Abbildung 12b zeigen die aus dieser Versuchsreihe ermittelten t_o- und e_T-Werte.

Tabelle 4: t_0-Zeiten und e_T-Werte (in Klammern) von D_2O, NO_3^-, Uracil und Thioharnstoff bei 5 verschiedenen mobilen Phasen (Acetonitril-Wasser 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 und 0:100, jeweils v/v), Temperatur 25 ± 0.1 °C

Acetonitril	100 %	70 %	50 %	30 %	0 %
Wasser	0%	30 %	50 %	70 %	100 %
D_2O	1.348	1.283	1.323	1.368	1.389
	(0.636)	(0.605)	(0.624)	(0.645)	(0.655)
NO_3^-	1.374	1.172	1.233	1.335	1.714
	(0.648)	(0.553)	(0.582)	(0.630)	(0.809)
Uracil	1.342	1.322	1.342	1.610	2.700
	(0.633)	(0.624)	(0.633)	(0.775)	> (1.000)
Thioharnstoff	1.348	1.360	1.539	1.801	2.280
	(0.636)	(0.642)	(0.726)	(0.850)	> (1.000)

Für einen exakten Vergleich müssten die Werte in Tabelle 5 noch um die Volumenänderung der mobilen Phase bei einer Temperaturerhöhung von 25 auf 50 °C korrigiert werden (102). Doch auch ohne diese Korrektur, die nur wenige Prozent beträgt, sieht man durch die geringeren e_T-Werte, daß Uracil ab einem Wasseranteil von 70 % und Thioharnstoff ab 50 % retardiert wird und daher bei diesen Wassergehalten mit zur t_0-Bestimmung verwendet werden können. Auch bei einer Temperatur von 50 °C schwankt der mit Nitrat ermittelte t_0-Wert als Funktion der Zusammensetzung der mobilen Phase deutlich mehr als der mit D_2O gemessene. Verwendet man den e_T-Wert als Kriterium, so kann man für Nitrat weder Retention noch Ausschluß annehmen, da die t_0-Werte immer innerhalb der oben angegebenen e_T-Grenzen liegen.

Tabelle 5: t_0-Zeiten und e_T-Werte (in Klammern) von D_2O, NO_3^-, Uracil und Thioharnstoff bei 5 verschiedenen mobilen Phasen (Acetonitril-Wasser 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 und 0:100, jeweils v/v), Temperatur 50 ± 0.1 °C

Acetonitril	100 %	70 %	50 %	30 %	0 %
Wasser	0 %	30 %	50 %	70 %	100 %
D_2O	1.422	1.280	1.321	1.338	1.338
	(0.671)	(0.604)	(0.623)	(0.631)	(0.631)
NO_3^-	1.342	1.190	1.229	1.541	1.641
	(0.633)	(0.561)	(0.580)	(0.727)	(0.774)
Uracil	1.392	1.283	1.354	1.362	2.518
	(0.657)	(0.605)	(0.638)	(0.640)	> (1.000)
Thioharnstoff	1.392	1.338	1.380	1.541	2.006
	(0.657)	(0.631)	(0.651)	(0.727)	> (1.000)

2.4.1.2. Linearisierung von Retentionsdaten homologer Reihen

In der GC kennt man mehrere rechnerische Verfahren zur exakten Ermittlung von t_0 (112), die alle auf einer Linearisierung von Retentionsdaten homologer Reihen beruhen. Da man in der RP-Chromatographie bisher kein allgemein anwendbares Verfahren zur Bestimmung von t_0 gefunden hat, wurde versucht, diese Methode auch auf die Flüssigkeitschromatographie zu übertragen (102,109-111).

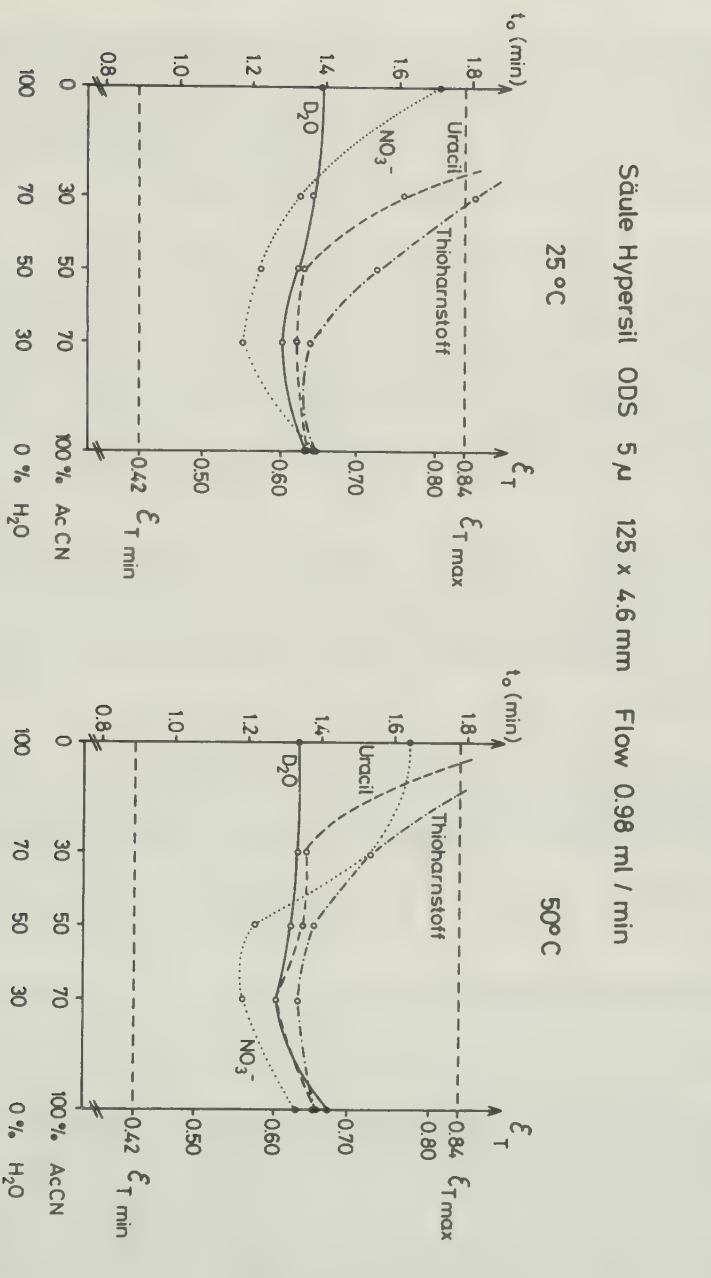


Abbildung 12: t_o- und e_T-Werte für verschiedene Totzeitmarker

Bei der Linearisierung von Retentionsdaten homologer Reihen geht man von einem theoretisch begründbaren linearen Zusammenhang zwischen der Nettoretention k' und der Anzahl der Kohlenstoffatome einer Substanz einer homologen Reihe aus, d.h. der Beitrag jeder Methylengruppe eines Probenmoleküls zur Nettoretention ist gleich groß, additiv und unabhängig von der Gesamtzahl der Methylengruppen (114).

Ein Verfahren arbeitet mit einem Rechenprogramm, das ein angenommes t_o' so lange variiert, bis die mit diesen t_o' ermittelten log k'-Werte, gegen die Anzahl der Kohlenstoffatome aufgetragen, eine Gerade ergeben. Die Problematik dieses Verfahrens liegt in der Streuung der Bruttoretentionsdaten, die aufgrund der experimentellen Bedingungen - Kurzzeitschwankungen der Fließgeschwindigkeit und der Temperatur sowie bei der Förderung aus zwei Pumpen in der Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse - mit einem gewissen Fehler behaftet sind. Das Rechenprogramm legt eine Ausgleichsgerade durch die errechneten k'-Werte und minimiert die Summe der Abstandsquadrate. In der Nähe von t_o allerdings ändert sich die Summe der Abstandsquadrate als Funktion eines angenommenen t_o' nicht sehr stark, und es hängt von den Abbruchbedingungen des Programms ab, wie genau t_o ermittelt wird. t_o- Werte, die mit diesem Verfahren ermittelt werden, erhalten im folgenden die Zuordnung "Verfahren 1".

Ein zweites Verfahren (Verfahren 2) zur Bestimmung von t_o aus den Bruttoretentionszeiten stammt von Berendsen et al. (96). Mit der Definition der Selektivität für zwei aufeinanderfolgende Glieder einer homologen Reihe kann man schreiben:

$$11) \quad a = \frac{k_{n+1}}{k_n} = \frac{(t_{n+1} - t_o) * t_o}{(t_n - t_o) * t_o}$$

Durch Umformen erhält man:

$$12) \quad t_{n+1} = a * t_n - (a - 1) * t_o$$

Trägt man t_{n+1} gegen t_n auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung a. Mit Hilfe des a-Wertes kann aus dem Achsenabschnitt t_o berechnet werden. Die prinzipielle Schwierigkeit dieses Verfahrens beruht auf der Ermittlung von t_o aus dem Achsenabschnitt. Schon eine geringe Änderung der Steigung durch die Streuung der Bruttoretentionszeiten kann eine deutliche Verschiebung des Achsenabschnitts mit sich bringen und damit den ermittelten t_o-Wert sehr verändern.

Mit vier verschiedenen mobilen Phasen (Acetonitril-Wasser-Mischungen 100:0, 70:30, 50:50 und 30:70, jeweils v/v) wurden mit vier stationären Phasen (LAB VII, LAB II, LAB III und LAB V) die Retentionsdaten von Alkylbenzolen bestimmt. Bei 100 und 70 % Acetonitril in der mobilen Phase werden von Benzol bis n-Decylbenzol alle injizierten Alkylbenzole von allen eingesetzten stationären Phasen eluiert. Ab 50 % Wasseranteil in der mobilen Phase steigt die Retentionszeit der längerkettigen Alkylbenzole exponentiell mit der Anzahl der Kohlenstoffatome an. Von allen Probensubstanzen, die in weniger als drei Stunden (k'-Wert etwa 150) von der Säule eluiert werden, wurden die Retentionszeiten dreimal bestimmt und der Mittelwert der drei Messungen für die weiteren Berechnungen verwendet. Um die mit rechnerischen Verfahrenen bestimmten t_0-Werte mit denen zu vergleichen, die durch Injektion von Totzeitmarkern ermittelt werden, wurden zusätzlich zu den Alkylbenzolen noch D_2O, NO_3^-, Uracil und Thioharnstoff auf die stationären Phasen aufgegeben.

Eine Analyse der Daten zeigt, daß beide rechnerischen Verfahren bei 50 und 70 % Wasser in der mobilen Phase zu hohe t_0-Werte ergeben. Bei LAB V und LAB III steigen die berechneten t_0-Werte für höheren Wasseranteil in der mobilen Phase kontinuierlich an, bei LAB II und LAB VII ergibt Verfahren 1 einen leichtenAbfall für 70 % Acetonitril, während Verfahren 2 wiederum stetig wachsende t_0-Werte errechnet. Diese Unterschiede in den t_0-Werten bei verschiedenen Polaritäten der mobilen Phase sind nicht nur auf die oben beschriebenen Fehlermöglichkeiten der rechnerischen Verfahren zurückzuführen. Vielmehr ist die Grundannahme beider Verfahren ein einheitlicher hydrophober Trennmechanismus. Diese Annahme ist bei 100 und 70 % Acetonitril am ehesten gerechtfertigt, bei hohem Wasseranteil ist aber noch ein zweiter Trennmechanismus, die Wechselwirkung mit Silanolgruppen, möglich.

Ein kontinuierlicher Anstieg der t_0-Werte bei den beiden RP-Phasen, die eine relativ hohe Beladung aufweisen, deutet auf einen wachsenden Anteil der silanophilen Wechselwirkungen mit steigendem Wassergehalt hin. Selbst bei vollkommen unpolaren Probensubstanzen wie Alkylbenzolen sind offensichtlich Wechselwirkungen mit Silanolgruppen möglich. Damit ist die Voraussetzung der rechnerischen Verfahren hinfällig, "wahre" t_0-Werte sind in der Flüssigkeitschromatographie über eine Linearisierung der Retentionsdaten homologer Reihen nicht erhältlich. Die in der Literatur publizierten Ergebnisse sind bei hohem organischen Anteil der mobilen Phase erzielt worden und deshalb bei einem nur geringen Anteil an silanophiler Wechselwirkung noch innerhalb des möglichen e_T-Bereiches.

Rechnerische Verfahren zur Bestimmung von t_0 sind in der Flüssigkeitschromatographie im Gegensatz zur GC nicht anwendbar.

Tabelle 6: t_0-Zeiten aus Linearisierungsverfahren und mit t_0-Markern

stationäre Phase	Methode	mobile Phase AcCN:H2O 100:0	70:30	50:50	30:70
LAB V	Verfahren 1	1.41	1.71	2.35	11.66
"	Verfahren 2	1.39	1.70	2.41	6.45
"	D_2O	1.37	1.35	1.20	1.27
"	NO_3^-	1.41	1.05	1.11	1.00
"	Uracil	1.49	1.23	1.21	1.31
"	Thioharnstoff	1.48	1.25	1.33	1.48
LAB III	Verfahren 1	1.40	1.69	2.30	8.20
"	Verfahren 2	1.42	1.67	2.33	4.66
"	D_2O	1.51	1.33	1.25	1.30
"	NO_3^-	1.52	1.06	1.14	1.02
"	Uracil	1.64	1.22	1.25	1.35
"	Thioharnstoff	1.56	1.29	1.56	1.57
LAB II	Verfahren 1	1.54	1.47	2.28	3.80
"	Verfahren 2	1.51	1.59	2.30	3.22
"	D_2O	1.62	1.50	1.37	1.44
"	NO_3^-	1.63	1.14	1.15	1.05
"	Uracil	1.67	1.34	1.37	1.50
"	Thioharnstoff	1.66	1.42	1.66	1.89
LAB VII	Verfahren 1	1.59	1.56	2.00	3.60
"	Verfahren 2	1.59	1.58	2.22	2.75
"	D_2O	1.70	1.45	1.39	1.45
"	NO_3^-	1.87	1.14	1.21	1.01
"	Uracil	1.76	1.36	1.39	1.51
"	Thioharnstoff	1.78	1.39	1.85	2.56

Bei diesen stationären Phasen, die sich in ihrer Beladung unterscheiden, fällt auf, daß die Phasen mit einer geringen Beladung (LAB II und LAB VII) ein größeres Totvolumen aufweisen als die höher beladenen Phasen LAB III und LAB V. Dies spricht für einen Einfluß der Alkylketten auf das Totvolumen, das nicht allein durch die Porenstruktur des Basismaterials bestimmt wird.

2.4.1.3. Bestimmung des Totvolumen aus den Systempeaks

Knox und Kaliszan definieren das thermodynamische Totvolumen als das Gesamtvolumen aller Komponenten der mobilen Phase in der Säule (108). Man kann das Totvolumen nach folgender Gleichung bestimmen:

$$13) \quad V_o = V_a * x_a + V_b * x_b + ...$$

wobei V_a, V_b, usw. das Volumen der isotopen-markierten Komponente der mobilen Phase ist und x_a, x_b usw. der Volumenanteil der entsprechenden Verbindung. Aus der Darstellung von Knox und Kaliszan folgt, daß das Totvolumen unabhängig von der Zusammensetzung der mobilen Phase ist. Jedoch zeigen auch ihre Messungen für verschiedene Zusammensetzungen der mobilen Phase geringe Abweichungen. Da aber auch geringe Variationen von V_o schon einen großen Effekt auf die berechneten k'-Werte haben können, wurde die Gültigkeit dieser Aussage nachgeprüft.

Dazu wurde als stationäre Phase Spherisorb ODS 2 in einer Säule der Dimension 125 mm Länge und 4.6 mm Durchmesser verwendet. Acetonitril-Wasser-Gemische der oben beschriebenen Zusammensetzungen wurden als mobile Phase eingesetzt, D_2O und CD_3CN mit einem UV- und einem RI-Detektor detektiert. Aus je fünf Messungen wurde ein Mittelwert für die Retentionszeit beider Probensubstanzen berechnet, die Fließgeschwindigkeit betrug 0.99 ml/min. Tabelle 7 gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 7: t_o- und e_T-Werte von D_2O und CD_3CN als Funktion der mobilen Phase

% Acetonitril	% Wasser	RT D_2O	RT CD_3CN	t_o	e_T
100	0	-	1.335	1.335	0.636
70	30	1.250	1.345	1.317	0.628
50	50	1.285	1.400	1.343	0.640
30	70	1.335	1.450	1.370	0.653
0	100	1.550	-	1.550	0.754

Die Daten zeigen eine Abhängigkeit des Volumens der mobilen Phase in der Säule von ihrer Zusammensetzung. Bei 100 % Acetonitril in der mobilen Phase sind die ODS-Ketten von Acetonitril solvatisiert und ragen von der Oberfläche der stationären Phase weg. Im gequollenen Zustand ist ihr Volumenbedarf natürlich größer als in einem geschrumpften Zustand. Deshalb bleibt der mobilen Phase weniger Volumen in dem konstanten Gesamtsäulenvolumen, die Totzeit ist klein. Mit steigendem Wassergehalt lagern sich die Ketten zusammen und bilden eine Schicht über dem Silicagelgrundgerüst. Das Volumen der mobilen Phase steigt dadurch an.

Mit einer mobilen Phase aus 50 % Acetonitril und 50 % Wasser wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 1.02 ml/min die Totzeiten bei verschiedenen stationären Phasen gemessen.

Tabelle 8: t_o- und e_T-Werte von D_2O und CD_3CN als Funktion der mobilen Phase

stationäre Phase	RT D_2O	RT CD_3CN	t_o	e_T
Spherisorb ODS 2	1.160	1.450	1.305	0.640
Hypersil ODS	1.226	1.534	1.380	0.676
Zorbax ODS	1.152	1.520	1.336	0.654
Lichrospher CH 18	1.248	1.666	1.457	0.713
Nucleosil C 18	1.330	1.766	1.548	0.758
Lab V	1.374	1.742	1.558	0.763

Es zeigen sich deutliche Unterschiede bei Verwendung verschiedener stationärer Phasen. Die e_T-Werte liegen zwischen 0.64 und 0.77, e_T-Werte unter 0.6, wie sie mit Nitrat bestimmt werden, ergeben sich bei diesem Verfahren nicht. Bedenkt man, daß die e_T-Werte von nicht modifizierten Silicagelen immer etwa 0.84 betragen (97), scheinen Werte zwischen 0.6 und 0.8 vernünftig. Für die untersuchten ODS-Phasen bedeuten die Versuchsergebnisse einen freien Querschnitt von etwa 65 bis 75 %. Im Vergleich mit den beiden anderen Verfahren, der Injektion von nicht retardierten und nicht ausgeschlossenen Substanzen und der Linearisierung von Retentionsdaten homologer Reihen, scheint das Vorgehen nach Knox und Kaliszan am ehesten "richtige" t_o-Werte zu ergeben, obwohl es auch für dieses Verfahren keine objektiven Überprüfungskriterien gibt. Für die Berechnung der k'-Werte wurde in dieser Arbeit deshalb ein nach diesem Verfahren ermittelter t_o-Wert zugrunde gelegt.

Es ist festzustellen, daß der Mangel an einem geeigneten Verfahren zur Ermittlung des Totvolumens und damit der richtigen Angabe der Kapazitätsfaktoren weiterhin besteht. In der Literatur wird allerdings viel zu selten auf die Bestimmungsmethode des Totvolumens hingewiesen, so daß die angegebenen k'-Werte nicht mit auf andere Weise bestimmten k'-Werten zu vergleichen sind.

2.4.3. Auswahl eines Testgemischs

In der Literatur gibt es sehr viele Vorschläge für die Zusammenstellung eines Testgemischs (41,51,116-118). Mit Hilfe des Testgemischs wird einmal die einwandfreie Arbeitsweise von Pumpen und Detektoren überprüft und zum zweiten die Leistungsfähigkeit des Säulenmaterials in Bezug auf Trennleistung (Bodenzahl), Selektivität und Peaksymmetrie (119). Die Zusammenstellung des Testgemischs ist dabei sehr davon abhängig, welche Säulenparameter vorrangig bestimmt werden sollen. Eine eher praktische Beschränkung ist durch den Detektor gegeben. Da viele Anlagen mit einem UV-Detektor arbeiten, sollten die ausgewählten Testsubstanzen sich bei 254 nm gut erfassen lassen. Fast alle Testsubstanzen enthalten daher einen Phenylring.

Da für den Verkauf von Säulenmaterialien hohe Bodenzahlen und Peaksymmetrien nahe 1 Werbeargumente sind, sind die Testgemische kommerzieller Phasen darauf ausgelegt, diese Parameter zu optimieren. Unpolare Verbindungen wie Alkylbenzole erfüllen im

allgemeinen diese Bedingungen bei der Chromatographie auf RP-Phasen, weshalb meist mindestens ein Vertreter der Reihe Benzol, Toluol, Ethylbenzol, n-Propylbenzol und n-Butylbenzol in den Testgemischen von Säulenanbietern vertreten ist

Mit Alkylbenzolen erhält man bei konstanter Zusammensetzung der mobilen Phase aus dem Vergleich der Retentionsdaten Aussagen über die hydrophobe Oberfläche der Phase. Phasen mit einer großen hydrophoben Oberfläche (hohe BET-Oberfläche des Basissilicagels, hohe Beladung und lange Alkylliganden) zeigen hohe k'-Werte, niedrig beladene Phasen oder Phasen mit kürzeren Alkylspacern entsprechend kleinere k'-Werte.

Von dem Verhalten polarer Substanzen auf RP-Phasen wird auf die Zugänglichkeit von Silanolgruppen rückgeschlossen. Dabei werden häufig nur mäßig polare, neutrale Testsubstanzen wie Alkohole, Aldehyde, Ketone und Ester verwendet. An den k'-Werten und den Peakasymmetrien basischer Substanzen kann man jedoch silanophile Wechselwirkungen weit besser untersuchen, da basische Substanzen sehr sensibel auf vorhandene Silanolgruppen reagieren. Verglichen mit Alkylbenzolen sind die mit Basen ermittelten Bodenzahlen der breiten Peaks wegen um eine Größenordnung niedriger und die Peakasymmetrien häufig weit über 1.5. Aus diesem Grund finden sich in den Testgemischen von Säulenherstellern keine basischen Substanzen.

Beim Vergleich mehrerer stationärer Phasen muß die Retentionszeit der Basen im Trenngemisch entweder durch ein on-line-UV-Spektrum oder durch die Retentionszeit kontrolliert werden, da mit dem vorhandenen empirischen Wissen das Verhalten einer Base auf einer RP-Phase nicht vorhersagbar ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich mit Alkylbenzolen und hohem Anteil des organischen Modifiers in der mobilen Phase die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase und Testsubstanz gut untersuchen lassen. Will man jedoch Aussagen über die Anzahl der zugänglichen Silanolgruppen machen, sind basische Testsubstanzen geeignete Indikatoren. Die Zusammenstellung des Testgemischs und die nachfolgende Interpretation der chromatographischen Experimente sollte sich an diesen beiden möglichen Wechselwirkungen orientieren.

2.2.3.3. Testen kommerzieller RP-Phasen

In Tabelle 9 sind einige Eigenschaften kommerzieller stationärer Phasen, wie sie aus Firmenschriften (78,79,120-122) zu ersehen sind, zusammengestellt. Die Angaben in der ersten Spalte beziehen sich auf die Partikelform, wobei "irregulär" für gebrochene und "rund" für sphärische Materialien steht. Die hier wiedergegebenen Werte zu BET-Oberfläche, Porengröße und Porenvolumen beziehen sich dabei auf das nicht modifizierte Ausgangssilicagel. Die BET-Oberflächen variieren zwischen 170 und über 350 m^2/g, die Porengröße zwischen 8 und 12 nm und das Porenvolumen von 0.7 bis 1.4 ml/g.

In Tabelle 10 a sind die wichtigsten Daten der RP-Phasen aufgelistet. Die Angabe der Funktionalität des verwendeten Silans (mono-, di- oder trifunktionell) und ob ein "endcapping" stattgefunden hat oder nicht (ja oder nein) ist aus den ^{29}Si-CP-MAS-NMR-Spektren ersichtlich, wird in manchen Fällen aber auch von den Herstellern angegeben. Eine im Hause durchgeführte CH-Analyse einer Probe jeder stationären Phase ergab den Kohlenstoffgehalt, die Packungsdichte bezeichnet die Menge an stationärer Phase, die in einer gepackten Säule pro Milliliter benötigt wird. Die chromatographische Partikelgröße wurde nach der Methode von Halasz über den Druckabfall der Säule bestimmt (123). Die chromatographisch bestimmten Teilchendurchmesser entsprechen in etwa den spezifizierten Firmenwerten. Bei einer mobilen Phase von 100 % Acetonitril sind die so bestimmten Korngrößen allerdings immer ein wenig größer als die mit einer Acetonitril-Wasser-Mischung (70:30 v/v) ermittelten.

Geht man davon aus, daß sich der Kohlenstoffgehalt einer vollständig mit Octadecylsilan umgesetzten RP-Phase durch eine Nachbehandlung mit TMS-Chlorid nicht mehr erhöht (124) und daß die von den Firmen publizierten BET-Oberflächen in etwa richtig sind, so kann man nach Formel 2 bis 5 die molare Menge an ODS, den Beladungsgrad und die Konzentration an Silanolgruppen bestimmen. In Tabelle 10 b sind die errechneten Werte für alle Phasen zusammengestellt.

Die an die Oberfläche gebundenen molaren Mengen an Alkylketten schwanken zwischen 0.9 mmol für Lichrospher CH 18 und 0.48 mmol für Spherisorb ODS 2. Betrachtet man die Beladung, so sind die Extremwerte hier 4.94 $\mu mol/m^2$ wiederum für Lichrospher CH 18 und 1.66 $\mu mol/m^2$ für Partisil ODS 3.

Tabelle 9: Eigenschaften kommerzieller Silicagele

Name	Partikel-form	Korn-größe(µm)	BET-Ober-fläche (m^2/g)	Poren-größe(nm)	Poren-volumen (ml/g)
Lichrospher	rund	5	250	10	1.4
Lichrosorb	irregul.	5	300	10	
Zorbax	rund	8	350	8	
Nucleosil	rund	7	350	10	1.0
Partisil	irregul.	5	> 350	8.5	0.85
Hypersil	rund	5	170	12	0.7
Spherisorb	rund	5	220	8	

Tabelle 10 a: Eigenschaften kommerzieller ODS-Phasen

Name	Funktionalität des Modifiers	und "endcapping"	Packungs-dichte g/ml	% C	chromatographische Partikelgröße (µm) AcCN:H2O in % 100: 0	70:30
Lichrospher	di-	nein	1.2	20.46	4.06	3.69
Lichrosorb	di-	nein	1.2	15.99	5.01	4.49
Zorbax	mono-	nein	1.3	14.30	7.33	6.42
Nucleosil	tri-	ja	1.2	12.99	5.35	4.88
Partisil	tri-	ja	1.2	10.67	5.80	5.27
Hypersil	tri-	ja	1.6	10.58	5.35	5.25
Spherisorb	tri-	ja	1.8	10.27	5.02	4.47

Tabelle 10 b: Phasendaten kommerzieller ODS-Phasen

Name	% C	BET	l	∂	P	S
		m^2/g	mmol	$\mu mol/m^2$	nm^2/Kette	µmol/g
Lichrospher	20.46	250	0.897	4.936	0.34	1.447
Lichrosorb	15.99	350	0.701	2.546	0.65	2.192
Zorbax	14.30	350	0.594	2.088	0.80	2.272
Nucleosil	12.99	350	0.601	2.105	0.79	2.275
Partisil	10.67	350	0.494	1.662	1.00	2.367
Hypersil	10.58	170	0.489	3.384	0.49	1.151
Spherisorb	10.27	220	0.475	2.528	0.66	1.498

Der für Lichrospher CH 18 errechnete Wert für die Beladung scheint allerdings zu hoch zu sein, was auch in dem sehr kleinen Wert von 0.65 nm^2 Platz pro ODS-Kette zum Ausdruck kommt. Wahrscheinlich ist in diesem Fall die mit 250 m^2 angegebene BET-Oberfläche größer oder aufgrund des difunktionellen Silans ist es partiell zur Ausbildung polymerer Schichten gekommen. Trotz des geringen Kohlenstoffgehalts von nur 10.58 % weist Hypersil durch die geringe Oberfläche ein hohe Beladung von 3.38 $\mu mol/m^2$ auf. Bezüglich der Konzentration der Silanolgruppen lassen sich deutlich zwei Gruppen unterschieden: eine, die 1.5 mmol/g und weniger Silanolgruppen aufweist, und eine zweite mit 2.2 mmol/g und mehr.

Die chromatographische Charakterisierung der genannten 7 stationären RP-Phasen wurde mit einem Testgemisch, bestehend aus vier polaren und vier unpolaren Testsubstanzen, durchgeführt. Die unpolaren Testsubstanzen Toluol, Ethylbenzol, n-Propylbenzol und n-Butylbenzol erlauben Aussagen über den hydrophoben Charakter der ODS-Phase, die polaren, besonders Benzamid, lassen Rückschlüsse über zugängliche Silanolgruppen zu. In Tabelle 11 und Abbildung 13 sind die Ergebnisse der chromatographischen Untersuchung, die mit einer mobilen Phase aus Acetonitril und Wasser (70:30, v/v) durchgeführt wurden, zu sehen.

Vergleicht man die in Tabelle 10 errechneten Phasendaten mit den Retentionsdaten aus Tabelle 11, so findet man keinen Zusammenhang zwischen den Retentionsdaten der Alkylbenzole und dem Kohlenstoffgehalt oder der Beladung. Sogar innerhalb der mit einem Silan gleicher Funktionalität hergestellten Phasen ist keine Korrelation zu finden. Auch beim Vergleich der Selektivität für Alkylbenzole (Tabelle 11 und Abbildung 13 b)

sind keine systematischen Beziehungen erkennbar. Dies bedeutet, daß die hydrophobe Oberfläche der RP-Phasen mit den errechneten Phasendaten nicht erfaßt wird.

Wie in einer früheren Arbeit festgestelt werden konnte (41), reagiert in dem hier verwendeten Trenngemisch Benzylamin am empfindlichsten auf SiOH-Gruppen. Sind wenige oder keine Silanolgruppen auf einer RP-Phase zugänglich, ist der k'-Wert von Benzylamin klein, sind viele SiOH-Gruppen zugegen, steigt der k'-Wert. Auf Hypersil ODS und Lichrospher CH 18 mit der geringsten Anzahl an SiOH-Gruppen wird Benzylamin nicht retardiert, die k'-Werte sind 0 bzw. 0.01. Mit Partisil ODS 3 und Lichrosorb RP 18 mit relativ vielen SiOH-Gruppen sind die k'-Werte mit 0.25 und 0.17 am höchsten. Eine Ausnahme bildet lediglich Nucleosil C18. Trotz einer hohen Konzentration an Silanolgruppen wird Benzylamin nicht retardiert. Dies ist nur zu erklären, wenn man annimmt, daß entweder die SiOH-Gruppen beim Nucleosil-Material für Probensubstanzen nicht zugänglich sind oder daß sie in einer Form vorliegen, die zu keiner Wechselwirkung mit dem polaren Benzylamin fähig ist. Bei der Diskussion der silanophilen Wechselwirkungen wird auf das besondere Verhalten der Nucleosil-Materials noch einmal eingegangen.

Tabelle 11: Retentions- und Selektivitätsdaten kommerzieller ODS-Phasen

Lichrospher CH 18		Lichrosorb RP 18		Zorbax ODS		Nucleosil C18	
k'	a	k'	a	k'	a	k'	a
0.01	2.867	0.17	1.904	0.08	2.739	0.01	-
0.28	2.209	0.33	1.970	0.23	2.397	0.15	2.894
0.63	1.536	0.65	1.472	0.55	1.629	0.43	1.618
0.98	1.845	0.96	1.742	0.89	1.870	0.69	1.727
1.81	1.381	1.67	1.366	1.66	1.417	1.20	1.376
2.51	1.477	2.28	1.448	2.35	1.502	1.65	1.449
3.70	1.474	3.30	1.452	3.53	1.506	2.39	1.496
5.46		4.79		5.32		3.44	

Fortsetzung Tabelle 11:

Partisil ODS 3		Hypersil ODS		Spherisorb ODS 2	
k'	a	k'	a	k'	a
0.25	1.838	0.00	-	0.06	3.800
0.45	1.808	0.12	2.897	0.21	2.404
0.82	1.394	0.34	1.695	0.51	1.584
1.15	1.524	0.58	1.969	0.80	1.866
1.75	1.327	1.14	1.432	1.50	1.402
2.32	1.396	1.63	1.513	2.10	1.493
3.23	1.397	2.47	1.496	3.14	1.481
4.52		3.70		4.65	

Abbildung 13 zeigt recht deutlich, wie schwierig es ist, eine Korrelation zwischen chromatographischem Verhalten und zugänglichen Phasendaten herzustellen. Bei genauer Betrachtung ist die einzige Gemeinsamkeit kommerzieller RP-18-Phasen die chemisch gebundene Octadecylkette an der Oberfläche des Silicagels.

Die verwendeten Ausgangsmaterialien unterscheiden sich bezüglich BET-Oberfläche, Porengröße und -volumen, die Modifizierung erfolgt nach einem jeweils eigenen Rezept. Um weitere systematische Untersuchungen durchzuführen, wurden im Hause modifizierte Silicagele verwendet, weil dadurch sichergestellt ist, daß weder das Ausgangssilicagel noch die Art der Modifizierung die Interpretation verfälschen.

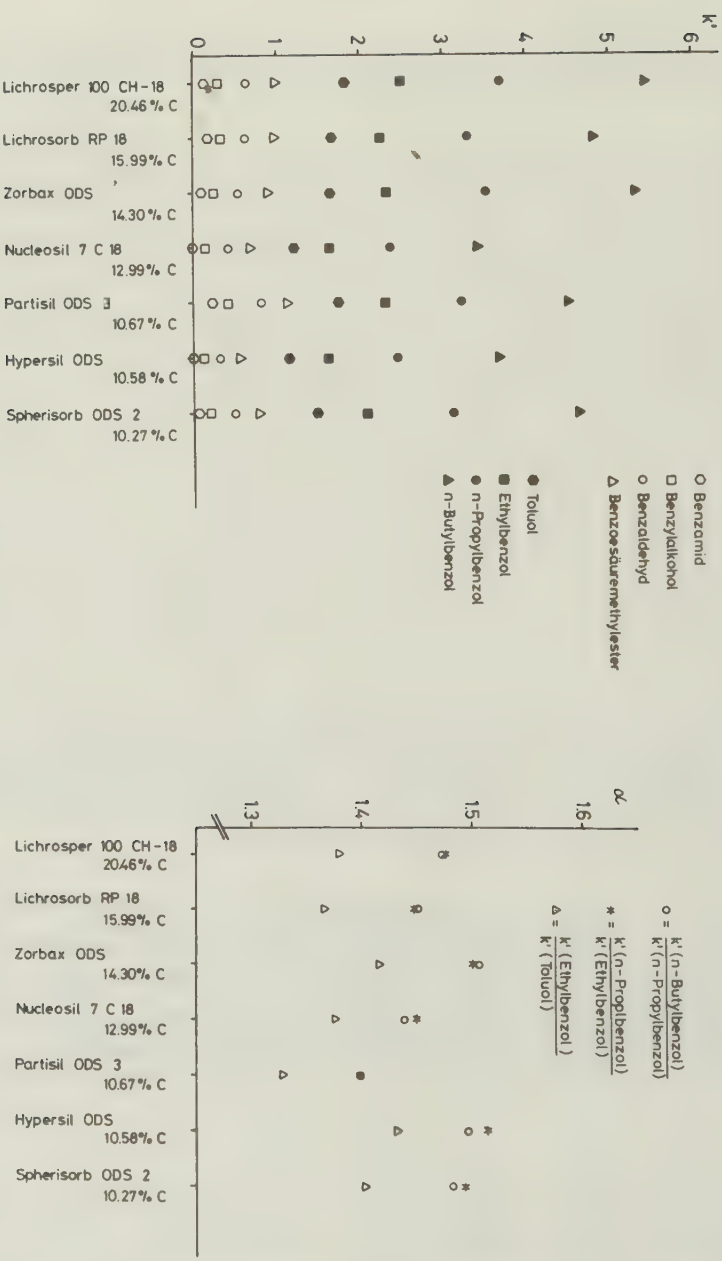


Abbildung 13: Vergleich von Retentions- und Selektivitätsdaten kommerzieller ODS-Phasen

3. HYDROPHOBE WECHSELWIRKUNGEN

Die bisher diskutierten Möglichkeiten der Charakterisierung der stationären Phase haben den Nachteil, daß die aus den Messungen erhaltenen Informationen nur bedingt für die Interpretation chromatographischer Effekte nützlich sind. Sowohl bei der CH-Analyse und der BET-Oberflächenbestimmung als auch bei den spektroskopischen Meßmethoden werden Eigenschaften der stationären Phase im "trockenen" Zustand, d.h. ohne Kontakt mit der mobilen Phase, bestimmt. Während einer chromatographischen Trennung modifiziert aber die mobile Phase die Eigenschaften der stationären Phase, indem sie das dynamische Verhalten der Oberflächenspezies verändert. Zur Untersuchung des Trennmechanismus mit spektroskopischen Mitteln sollten deshalb Bedingungen gewählt werden, die denen in einer chromatographischen Säule möglichst nahe kommen.

Suspendiert man eine Probe der stationären Phase in der mobilen Phase, kann man die Eigenschaften dieses Systems mit NMR-Methoden untersuchen (40). Es ist beispielsweise möglich, mit ^{13}C-Relaxationsmessungen Aussagen über das dynamische Verhalten der Alkylketten einer RP-Phase als Funktion der Beladung und der mobilen Phase zu erhalten. Gilpin und Gangoda haben die Beweglichkeit bestimmter, ^{13}C-markierter Positionen einer RP-Phasen als Funktion der mobilen Phase gemessen (44,45). McNally und Rogers machen über die Linienbreite von Suspensionspektren kommerzieller Phasen in verschiedenen Lösungsmitteln Aussagen über Konformationsänderungen der Alkylliganden (42). Schließlich haben Marshall und McKenna die Benetzung von Alkylketten durch geringe Konzentrationen an Wasser über die Relaxationszeiten von D_2O bestimmt (125).

In der vorliegenden Arbeit wurden von im Hause hergestellten RP-Phasen ^{13}C-Relaxationsspektren aufgenommen. Die eingesetzten RP-Phasen wurden durch eine monofunktionelle Umsetzung unter gleichen Reaktionsbedingungen hergestellt, so daß bis auf die Beladung eine einheitliche Struktur der stationären Phasen sowie die Charakterisierung durch CH-Analyse, BET-Oberflächenbestimmung und Festkörper-NMR gewährleistet ist. Auch die aufwendige Präparation ^{13}C-markierter Verbindungen erübrigt sich, da die natürliche Häufigkeit des ^{13}C-Kerns ausreichend für die Spektrenaufnahme ist. Dies hat den weiteren Vorteil, daß nicht nur eine definierte Position der Alkylkette

beobachtbar ist, sondern alle Kohlenstoffatome der RP-Phase in einer Messung gleichzeitig erfaßt werden.

3.1. ALLGEMEINES ZU RELAXATIONSMESSUNGEN

In einem NMR-Experiment wird die Gleichgewichtsmagnetisierung Mo, die parallel zum angelegten äußeren Magnetfeld Ho gerichtet ist, durch Einstrahlen einer Radiofrequenz senkrecht zu Ho ausgelenkt. Dadurch kommt es zu einer Quermagnetisierung $M_{y'}$, die im NMR-Empfänger gemessen werden kann. Die Wiederherstellung des Gleichgewichts ist von zwei unabhängigen Prozessen geprägt, dem Abfall der Quermagnetisierung auf null und dem Wiederaufbau der Gleichgewichtsmagnetisierung Mo. Beide Vorgänge zusammen werden als Relaxation bezeichnet.

Der Rückgang der Quermagnetisierung beruht auf einem Verlust der Phasengleichheit der präzedierenden Magnetvektoren, der als exponentiell mit der Zeitkonstante T_2 abfallender freier Induktionsabfall (free induction decay = FID) in der NMR-Empfängerspule beobachtet wird. Man bezeichnet diesen Vorgang als Spin-Spin-Relaxation und T_2 als Spin-Spin-Relaxationszeit.

Der zweite Relaxationsvorgang, die Rückkehr der longitudinalen Magnetisierung Mz auf den Gleichgewichtszustand Mo, wird Spin-Gitter-Relaxation genannt und durch Gleichung 14 beschrieben. Beide Relaxationsvorgänge sind in Abbildung 14 veranschaulicht.

$$14) \quad \frac{dMz}{dt} = \frac{Mz - Mo}{T_1}$$

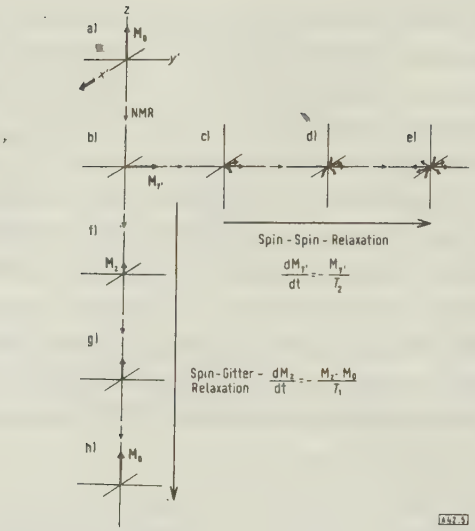
Die Spin-Gitter-Relaxation beschreibt den Energieaustausch der angeregten Kerne mit ihrer Umgebung und geschieht über die Wechselwirkung der Magnetvektoren mit fluktuierenden Zusatzfeldern, deren Fluktuationsfrequenz in der Größenordnung der Larmorfrequenz der angeregten Kerne liegt.

Die Spin-Gitter-Relaxation setzt sich aus Beiträgen der Relaxation aufgrund der Anisotropie der chemischen Verschiebung, der skalaren Kopplung, der Spin-Rotation und der internuklearen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zusammen, wobei Dipol-Dipol-Wechselwirkungen den wichtigsten Relaxationsmechanismus für mit Wasserstoff verbundene ^{13}C-Kerne darstellen. Da der ^{1}H-Kern ebenso wie der ^{13}C-Kern ein eigenes lokales magnetisches Feld erzeugt, beide aber durch eine Bindung miteinander verknüpft sind, "sieht" der ^{13}C-Kern außer dem äußeren Magnetfeld Ho auch das lokale Magnetfeld des Wasserstoffatoms. Durch eine Bewegung des Moleküls ändern sich ständig die Orientierungen beider Kerne relativ zu Ho, was eine permanente magnetische Reorientierung beider Kernspins zur Folge hat. Auf diese Weise entstehen die fluktuierenden Lokalfelder, über die die Relaxation beider Kerne vonstatten geht. Es besteht also ein enger Zusammenhang zwischen der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 und der Beweglichkeit eines Moleküls (126-128).

Die Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 erfolgt nach der Inversions-Erholungs-methode, bei der die Gleichgewichtsmagnetisierung durch einen 180° Impuls invertiert wird. Durch Relaxationsprozesse nimmt die Magnetisierung in -Mo-Richtung ab und strebt der Gleichsgewichtsmagnetisierung Mo zu. Strahlt man nach einer definierten Wartezeit t einen 90° Impuls ein, wird die noch verbliebene Magnetisierung in die xy-Ebene gedreht und dort im NMR-Empfänger ein FID induziert. Besteht vor dem 90° Impuls eine negative Magnetisierung, ergibt die Fourier-Transformation ein negatives NMR-Signal. Ist die Wartezeit t = to gerade so groß, daß keine Magnetisierung in z-Richtung besteht, wird kein NMR-Signal erzeugt. Man nennt to Wartezeit für den Nulldurchgang. Wird die Wartezeit t größer als to, nimmt der Wiederaufbau der longitudinalen Magnetisierung positive Werte an, und das resultierende NMR-Signal ist ebenfalls positiv.

Die Berechnung der Relaxationszeit erfolgt über die oben angegebene Bloch'sche Differentialgleichung 14. Eine Integration in den Grenzen t = 0 bis t sowie Mz = Mo bis Mt ergibt:

$$15) \qquad \ln (Mo - Mt) - \ln 2\,Mo = -t/T_1$$



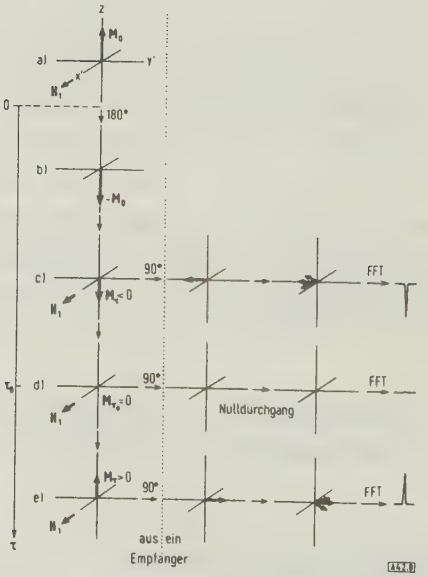


Abbildung 14: Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxation

Die Gleichgewichtsmagnetisierung Mo erhält man, wenn der untersuchte Kern ausrelaxiert ist, also bei $t = \infty$. Für die praktische Anwendung genügt allerdings ein t-Wert, der etwa fünfmal größer als T_1 ist. Mit einem Regressionsprogramm wird T_1 dann aus allen NMR-Spektren einer Relaxationsmessung ermittelt. Falls der Wert von Mo durch die vorgegebenen Wartezeiten nicht erfaßt wird, kann man T_1 auch aus der Wartezeit des Nulldurchgangs ermitteln. In Gleichung 15 wird $t = to$ und $Mt = 0$ und somit:

16) $T_1 = to/\ln 2$

^{13}C-Relaxationszeiten werden von der Schnelligkeit der Molekülbewegung im Verhältnis zur ^{13}C-Larmorfrequenz bestimmt. Als Maß für die Beweglichkeit gilt die durchschnittliche Zeit, die ein Molekül zwischen zwei Reorientierungen benötigt. Bezogen auf den Einheitskreis wird diese Zeit als effektive molekulare Korrelationszeit tc bezeichnet. Die Korrelationsfunktion $T_1 = f(tc)$ durchläuft für Magnetfeldstärken von 2.1 Tesla (entsprechend einer Meßfrequenz von 22.6 MHz für ^{13}C-Kerne) ein Minimum bei Korrelationszeiten von 10^{-9} sec. Dieses Minimum wird bei Magnetfeldstärken von 4.7 Tesla (entsprechend einer Meßfrequenz von 50.3 MHz für ^{13}C-Kerne) zu kleineren Korrelationszeiten, d.h. größeren T_1-Werten verschoben. Daher müssen für T_1-Messungen bei höheren Magnetfeldstärken längere Wartezeiten verwendet werden.

3.2. NMR-UNTERSUCHUNGEN AN RP-PHASEN

3.2.1. Vergleich von Festkörper- und Suspensions-NMR-Messungen

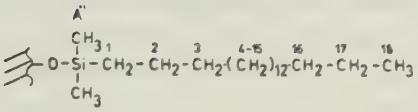
Abbildung 15 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum einer Suspension von LAB I in deuteriertem Acetonitril. Ein Vergleich mit dem ^{13}C-CP-MAS-Festkörperspektrum der gleichen stationären Phase zeigt die gleichen charakteristischen Signale der ODS-Kette. Neben dem Septett der CD_3-Gruppe des Lösungsmittels bei 0 ppm sieht man bei 15 ppm das Signal der terminalen Methylgruppe C18 sowie bei 24 ppm die Resonanz für die

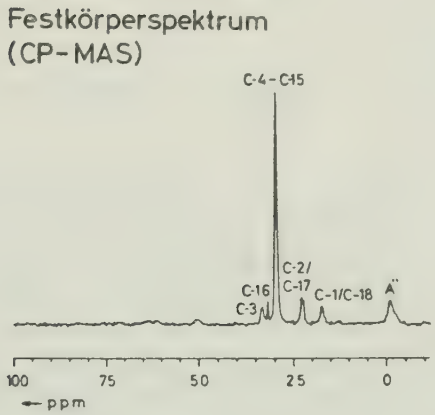
Kohlenstoffatome C17 und C2. Das Signal des mittleren Teils der ODS-Kette mit den Kohlenstoffatomen C4 bis C15 erscheint bei einer chemischen Verschiebung von 30 ppm und verdeckt fast die noch als Schulter erkennbare und zu niedrigem Feld verschobene Resonanz von C3 und C16. Die Signale des C1 und C2 sind wegen der Bindung an die Oberfläche des Silicagels auf 300 bis 500 Hz verbreitert deshalb nicht genau zuzuordnen. Die Zuordnung erfolgte analog der Zuordnung des gelösten Octadecyldimethylsilans und des Festkörperspektrums. In Tabelle 12 sind die chemischen Verschiebungen nochmals aufgelistet, die beobachtete Tieffeldverschiebung der an die Oberfläche gebundenen Alkylkohlenstoffatome stimmt mit den in der Literatur berichteten Ergebnissen überein.

Tabelle 12: Chemische Verschiebung von Octadecyldimethylmethoxysilan und der Reaktionsprodukte mit Nucleosil 100

Lösungsmittel Meßmethode	C1	C2	C3	C4-C15	C16	C17	C18	Si-CH_3
Silan C_6D_6-Lösung	16.4	23.6	33.9	30.2	32.3	23.2	14.3	-2.5
LAB I CP-MAS	17.4	22.8	33.3	29.6	31.8	22.3	14.4	-1.1
LAB I CD_3CN-Suspension	-	23.5	32.8	30.6	32.8	23.5	14.6	-

Um sicherzustellen, daß die beobachteten Signale von kovalent gebundenem und nicht etwa von auf der Oberfläche des Silicagels absorbiertem Silan stammen, wurden die Halbwertsbreiten von freiem ODS in Lösung, von ODS in einer Suspension von Silicagel und CD_3CN und der chemisch an Silicagel gebundenen ODS-Kette bestimmt. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse für die Halbwertsbreite des Hauptsignals der ODS-Kette (C4 bis C15) bei 30 ppm zusammengestellt.





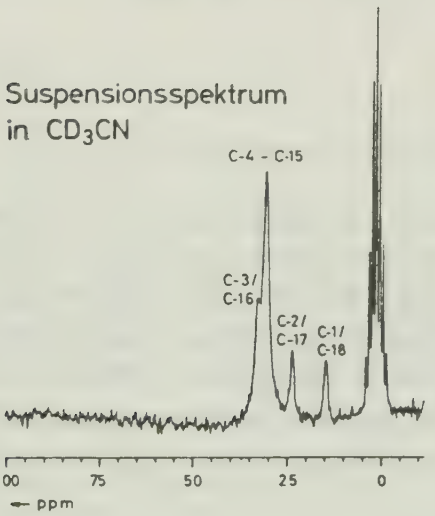


Abbildung 15: Festkörper- und Suspensions-^{13}C-NMR-Spektrum einer ODS-Phase

Tabelle 13: Halbwertsbreiten und T_1-Zeiten des Hauptsignals der ODS-Kette für freies ODS, ODS suspendiert mit Silicagel und kovalent gebundenem ODS

Verbindung	T_1 (sec)	$\Delta\nu/2$ (Hz)	Lösungsmittel
ODS	1.16	4.4	C_6D_6
ODS (in Suspension mit Nucleosil)	-	16	CD_3CN
LAB I (ODS kovalent gebunden)	0.35	90	CD_3CN

Während das freie ODS in benzolischer Lösung eine Halbwertsbreite von 4.4 Hz und eine T_1-Zeit von 1.16 sec aufweist, steigt für das mit Silicagel suspendierte ODS die Halbwertsbreite aufgrund der Anwesenheit unlöslicher Silicapartikel und der Adsorption von ODS an Silicagel auf 16 Hz. Die an die Oberfläche des Silicagels kovalent gebundene ODS-Kette zeigt mit 90 Hz eine deutliche Linienverbreiterung. Dies ist ein Hinweis auf eine verringerte Beweglichkeit, die von freiem über das adsorbierte zum gebundenen ODS hin abnimmt. Gleichzeitig steigt die Halbwertsbreite des NMR-Signals in dieser Richtung an.

3.2.2. Relaxationszeitmessungen an RP-Phasen

Die Beweglichkeit von z.B. Methylgruppen kann bei einer Abnahme der Spin-Gitter-Relaxation entweder zu- oder abnehmen. Durch temperaturabhängige Messungen konnte bewiesen werden, daß eine Abnahme der T_1-Werte ebenfalls eine Verringerung der Beweglichkeit zur Folge hat (40). Abbildung 16 zeigt die typischen NMR-Spektren einer Spin-Gitter-Relaxationszeitmessung. Neben den Signalen des Lösungsmittels CD_3CN (ein Septett der CD_3-Gruppe bei 0 ppm und ein Singulett der CN-Gruppe bei 118 ppm) enthalten die Spektren die Signale der ODS-Kette, wie sie aus Abbildung 15 bekannt sind.

In den Spektren der ODS-Phasen repräsentiert das Hauptsignal bei etwa 30 ppm die mittlere Beweglichkeit der Alkylkette, die aus Rotations-, Torsions- und Translationsbeiträgen bestehen kann. Die Kohlenstoffatome C1, C2, C17 und C18 absorbieren bei anderen ppm-Werten und leisten keinen Beitrag zur Relaxationszeit des mittleren Teils der Kette. Für C17 und C18 kann man einen eigenen T_1-Wert angeben. Obwohl die chemische Verschiebung von C18 und C1 sowie C17 und C2 gleich ist, das Signal also jeweils beide Kohlenstoffatome repräsentiert, sind C1 und C2 nicht beobachtbar, da sie aufgrund der Bindung an die Silicageloberfläche so unbeweglich sind, daß die resultierenden breiten Signale nicht vom Untergrundrauschen zu unterscheiden sind.

Im Falle von LAB III, einer RP-Phase mit 13.77 % C, entsprechend einer mittleren Beladung, ist in deuteriertem Acetonitril die Wartezeit für den Nulldurchgang des Hauptsignals 0.24 sec. Daraus errechnet man eine T_1-Zeit von 0.350 sec. Das Kohlenstoffatom C17 weist den Nulldurchgang bei 0.45 sec (T_1 = 0.650) auf, die terminale Methylgruppe relaxiert erst oberhalb einer Wartezeit von 0.50 sec. Wie zu erwarten war, besitzt die terminale Methylgruppe aufgrund der großen Entfernung zur Bindungsstelle und des zusätzlichen Rotationsfreiheitsgrades die größte Beweglichkeit (den höchsten T_1-Wert) (45). In Tabelle 14 sind die Wartezeiten für die Nulldurchgänge und die T_1-Zeiten verschieden hoch beladener Phasen zusammengestellt.

Tabelle 14: Relaxationszeiten als Funktion der Beladung

Phase	% C	C3 - C16		C17		C18	
		t (sec)	T_1 (sec)	t (sec)	T_1 (sec)	t (sec)	T_1 (sec)
LAB I	12.53	0.24	0.350	0.50	0.720	0.60	0.870
LAB II	8.32	0.33	0.480	0.65	0.940	0.70	1.000
LAB IIe	10.83	0.20	0.290	0.45	0.650	0.50	0.720
LAB III	13.77	0.24	0.350	0.45	0.650	> 0.50	> 0.720
LAB V	16.16	0.24	0.350	0.40	0.580	> 0.50	> 0.720

LAB IIIe
suspendiert in 2400 µl CD_3CN

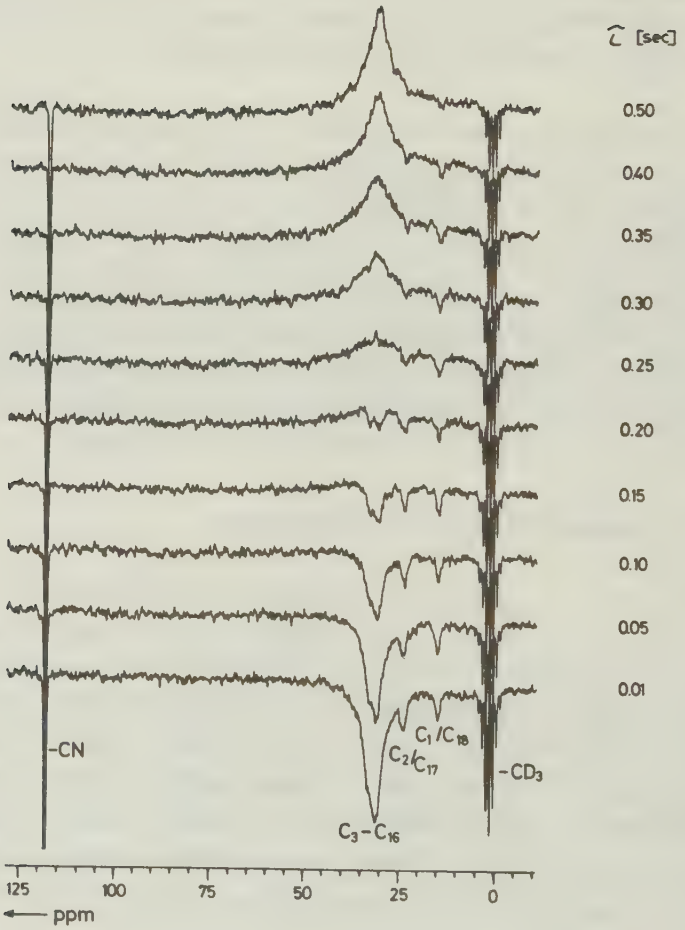


Abbildung 16: ^{13}C-Spin-Gitter-Relaxationsmessung einer ODS-Phase

Sämtliche Werte in Tabelle 14 beziehen sich auf eine Suspension in CD_3CN. Da alle RP-Phasen nach dem gleichen Verfahren aus dem gleichen Ausgangssilicagel hergestellt wurden, gibt in diesem Fall der Kohlenstoffgehalt direkt Auskunft über die Beladung. Die Beweglichkeit der Alkylgruppen ist an der nur gering beladenen Phase LAB II am größten, da dort den Alkylliganden im Mittel der meiste Platz zur Verfügung steht. Mit zunehmender Beladung nimmt die Beweglichkeit ab. Dies gilt sowohl für den mittleren Teil der ODS-Kette als auch für die beiden terminalen Kohlenstoffatome.

Auf den ersten Blick scheint LAB IIe mit einem Kohlenstoffgehalt von nur 10.83 %, aber mit der geringsten Beweglichkeit der Alkylkette (T_1 = 0.29 sec), eine Ausnahme zu bilden. LAB IIe wurde durch Nachsilanisierung von LAB II hergestellt. Vergleicht man die Anzahl der modifizierten Silanolgruppen, so wurden pro Gramm Phase bei LAB II 0.35 mmol ODS gebunden, bei LAB I 0.52 mmol, bei LAB III 0.57 und bei LAB V 0.67 mmol. Für LAB IIe kommen zu den 0.35 mmol ODS noch 0.7 mmol TMS hinzu, im Gesamten also 1.05 mmol umgesetzte Silanolgruppen (vergleiche auch Tabelle 32).

Die Beweglichkeit einer Alkylkette ist demnach nicht nur von der Anzahl der Alkylketten pro Fläche abhängig, sondern auch davon, ob die Phase eventuell mit Trimethylsilan nachbehandelt wurde. Durch die kurzen Trimethylsilylreste wird die Beweglichkeit der Alkylketten nahe der Bindungsstelle eingeschränkt, weshalb auch die Gesamtbeweglichkeit der Kette sinkt.

Um den Einfluß verschiedener mobiler Phasen auf das dynamische Verhalten der Alkylketten zu untersuchen, wurden die Spin-Gitter-Relaxationsmessungen in CD_3CN-D_2O-Suspensionen mit unterschiedlichem Anteil D_2O durchgeführt. Obwohl die Unterschiede in den T_1-Zeiten sehr gering sind, konnte eine Verringerung der Beweglichkeit mit steigendem Wassergehalt in der Suspension festgestellt werden (Tabelle 15). Durch das polare Wasser in der mobilen Phase wird die Beweglichkeit der Alkylketten reduziert, da sie weniger gut solvatisiert sind als in dem weniger polaren Acetonitril.

Tabelle 15: Relaxationsmessungen als Funktion der Polarität der mobilen Phase

Phase	$CD_3CN/$ D_2O	C3 - C16		C17		C18	
		t (sec)	T_1 (sec)	t (sec)	T_1 (sec)	t (sec)	T_1 (sec)
LAB I	100: 0	0.24	0.350	0.50	0.720	0.60	0.870
LAB I	70:30	0.23	0.330	0.45	0.650	0.70	1.000
LAB I	50:50	0.22	0.320	0.35	0.500	0.50	0.720
LAB I	10:90	0.20	0.290	-	-	0.50	0.720
LAB II	100: 0	0.33	0.480	0.65	0.940	0.70	1.000
LAB II	70:30	0.32	0.460	-	-	-	-
LAB IIe	100: 0	0.20	0.290	0.45	0.650	0.50	0.720
LAB IIe	70:30	0.19	0.280	-	-	-	-
LAB III	100: 0	0.24	0.350	0.45	0.650	>0.50	> 0.720
LAB III	50:50	0.23	0.330	0.30	0.430	0.60	0.870
LAB V	100: 0	0.24	0.350	0.40	0.580	>0.50	> 0.720
LAB V	70:30	0.22	0.320	0.40	0.580	>0.50	> 0.720
LAB V	50:50	0.22	0.320	0.35	0.500	0.50	0.720

3.3. HPLC-UNTERSUCHUNGEN

In den Suspensions-NMR-Messungen wird die stationäre Phase im gleichen Zustand wie in einem chromatographischen Experiment vermessen. Um Beziehungen zwischen spektroskopischen und chromatographischen Daten herzustellen, wurden mit 4 verschiedenen stationären Phasen chromatographische Untersuchungen durchgeführt. Dabei kamen zwei niedrig beladene RP-Phasen (LAB VII und LAB II mit 7.38 bzw. 8.32 % C), eine Phase mit mittlerer Beladung (LAB III mit 13.77 % C) und eine nahezu vollständig beladene Phase (LAB V mit 16.16 % C) zum Einsatz.

Als Testsubstanzen wurden homologe Alkylbenzole von Benzol bis n-Decylbenzol verwendet, die isokratischen mobilen Phasen waren Acetonitril bzw. Acetonitril-Wasser-Gemische (70:30, 50:50 und 30:70, jeweils v/v). In Tabelle 16 sowie in Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Meßreihen dargestellt.

Die logarithmische Auftragung der k'-Werte gegen die Anzahl der Kohlenstoffatome der Alkylseitenkette bzw. gegen die molekulare Oberfläche der Testsubstanzen ergibt dabei in jedem Fall eine Gerade. Lediglich die drei ersten Werte, die bei 100 % Acetonitril auf den niedrig beladenen Phasen LAB II und LAB VII gemessen wurden, weichen ab. Allerdings sind die k'-Werte dieser Substanzen sehr klein, so daß sich geringe Fehler in der Bestimmung der Totzeit sehr stark auswirken.

Um die Beweglichkeiten der Alkylketten mit chromatographischen Daten zu vergleichen, wurde für jede Phase bei jeder mobilen Phase die durchschnittliche Selektivität pro Methylengruppe bestimmt (Tabelle 17). Dabei wurden nicht die in Tabelle 16 errechneten k'-Werte verwendet, sondern mit den Bruttoretentionszeiten wurde nach Gleichung 12 aus der Steigung der Geraden die durchschnittliche Selektivität bestimmt. Die durchschnittliche Selektivität unterscheidet sich erst in der zweiten Stelle hinter dem Komma von den Selektivitäten, die man aus den k'-Werten erhält.

Die mittlere Beweglichkeit der Alkylkette nimmt mit zunehmender Beladung der ODS-Phase ab, die Methylengruppenselektivität in der gleichen Richtung zu. In den T_1-Zeiten von LAB II und LAB V sind mit 0.48 und 0.35 sec die Unterschiede genauso deutlich wie in den a-Werten (1.177 und 1.248). Andererseits besteht zwischen den Selektivitäten von LAB III und LAB V ein relativ deutlicher Unterschied und dennoch ist die mittlere Beweglichkeit der Alkylkette mit einer T_1-Zeit von 0.35 sec gleich. Die Meßgenauigkeit der T_1-Zeit reicht in diesem Fall nicht aus, um zwischen beiden stationären Phasen zu diskriminieren.

Tabelle 16: Retentionsdaten der Alkylbenzole bei verschiedenen mobilen und stationären Phasen

a) stationäre Phase: LAB VII (7.38 % C)

	mobile Phase: Acetonitril - Wasser (v/v)							
	100 : 0		70 : 30		50 : 50		30 : 70	
n	k'	ln k'	k'	ln k'	k'	ln k'	k'	ln k'
0	0.01	-5.13	0.44	-0.91	1.64	0.49	3.94	1.37
1	0.01	-4.44	0.56	-0.66	2.30	0.83	7.10	1.96
2	0.02	-3.75	0.69	-0.44	3.17	1.15	12.56	2.53
3	0.04	-3.34	0.88	-0.19	4.55	1.51	24.00	3.18
4	0.06	-2.83	1.10	0.05	6.45	1.86	46.63	3.84
5	0.07	-2.65	1.40	0.29	9.26	2.23	90.72	4.51
6	0.09	-2.43	1.78	0.53	13.35	2.59	-	-
7	0.11	-2.25	2.27	0.78	19.50	2.97	-	-
8	0.13	-2.04	2.90	1.03	28.86	3.36	-	-
9	0.15	-1.88	3.69	1.27	41.89	3.74	-	-
10	0.21	-1.58	4.77	1.53	62.40	4.13	-	-

b) stationäre Phase: LAB II (8.32 % C)

	mobile Phase: Acetonitril - Wasser (v/v)							
	100 : 0		70 : 30		50 : 50		30 : 70	
n	k'	ln k'	k'	ln k'	k'	ln k'	k'	ln k'
0	0.01	-5.08	0.39	-0.95	1.74	0.56	4.33	1.46
1	0.02	-3.99	0.52	-0.65	2.47	0.90	7.86	2.06
2	0.02	-3.70	0.66	-0.42	3.45	1.24	14.08	2.64
3	0.04	-3.14	0.87	-0.14	5.03	1.62	27.15	3.30
4	0.06	-2.79	1.14	0.13	7.34	1.99	52.81	3.97
5	0.08	-2.52	1.47	0.38	10.74	2.37	104.72	4.65
6	0.11	-2.20	1.91	0.65	15.86	2.76	-	-
7	0.14	-1.95	2.52	0.92	23.63	3.16	-	-
8	0.17	-1.76	3.31	1.20	37.85	3.63	-	-
9	0.22	-1.50	4.33	1.47	57.69	4.05	-	-
10	0.27	-1.30	5.75	1.75	88.32	4.48	-	-

Fortsetzung Tabelle 16:

c) stationäre Phase: LAB III (13.77 % C)

	mobile Phase: Acetonitril - Wasser (v/v)							
	100 : 0		70 : 30		50 : 50		30 : 70	
n	k'	ln k'	k'	ln k'	k'	ln k'	k'	ln k'
0	0.11	-2.18	0.97	-0.03	3.50	1.25	10.33	2.34
1	0.16	-1.84	1.34	0.29	5.50	1.71	20.55	3.02
2	0.19	-1.65	1.78	0.58	8.46	2.13	40.33	3.70
3	0.26	-1.33	2.47	0.91	13.79	2.62	85.68	4.45
4	0.32	-1.13	3.45	1.24	22.36	3.11	-	-
5	0.40	-0.92	4.81	1.57	36.30	3.59	-	-
6	0.50	-0.70	6.79	1.92	60.16	4.10	-	-
7	0.62	-0.47	9.65	2.27	99.94	4.60	-	-
8	0.77	-0.26	13.73	2.62	-	-	-	-
9	0.95	-0.05	19.65	2.98	-	-	-	-
10	1.17	0.15	28.15	3.34	-	-	-	-

d) stationäre Phase: LAB V (16.16 % C)

	mobile Phase: Acetonitril - Wasser (v/v)							
	100 : 0		70 : 30		50 : 50		30 : 70	
n	k'	ln k'	k'	ln k'	k'	ln k'	k'	ln k'
0	0.22	-1.52	0.99	- 0.01	3.88	1.35	12.16	2.50
1	0.28	-1.28	1.42	0.35	6.24	1.83	24.95	3.22
2	0.33	-1.11	1.96	0.67	9.80	2.28	50.18	3.92
3	0.41	-0.89	2.84	1.05	16.44	2.79	113.24	4.73
4	0.51	-0.67	4.11	1.41	27.63	3.32	-	-
5	0.62	-0.48	5.93	1.78	46.47	3.84	-	-
6	0.78	-0.25	8.71	2.16	78.33	4.36	-	-
7	0.97	-0.03	12.84	2.55	134.33	4.90	-	-
8	1.20	0.18	19.06	2.95	-	-	-	-
9	1.50	0.40	28.41	3.35	-	-	-	-
10	1.87	0.63	42.25	3.74	-	-	-	-

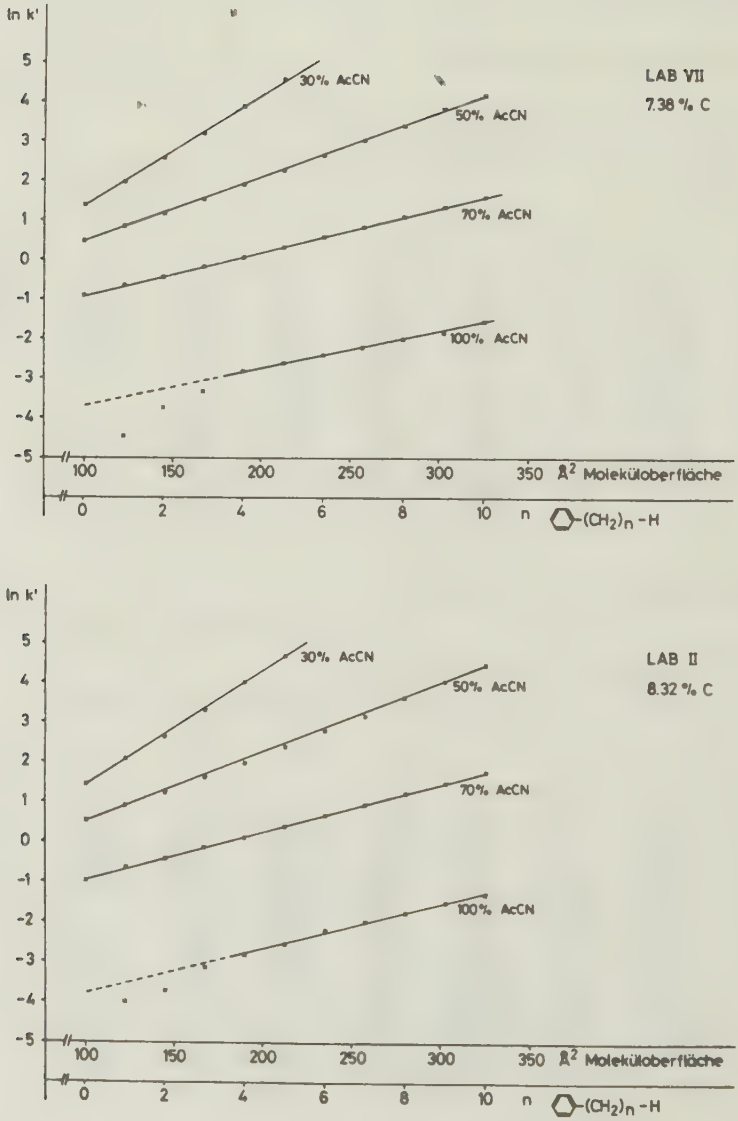


Abbildung 17: Retention der homologen Alkylbenzole: ln k' als Funktion der Molekülоberfläche bzw. Anzahl der Methylengruppen LAB VII (7.38 % C) (Abb. 17a) und LAB II (8.32 % C) (Abb.17b)

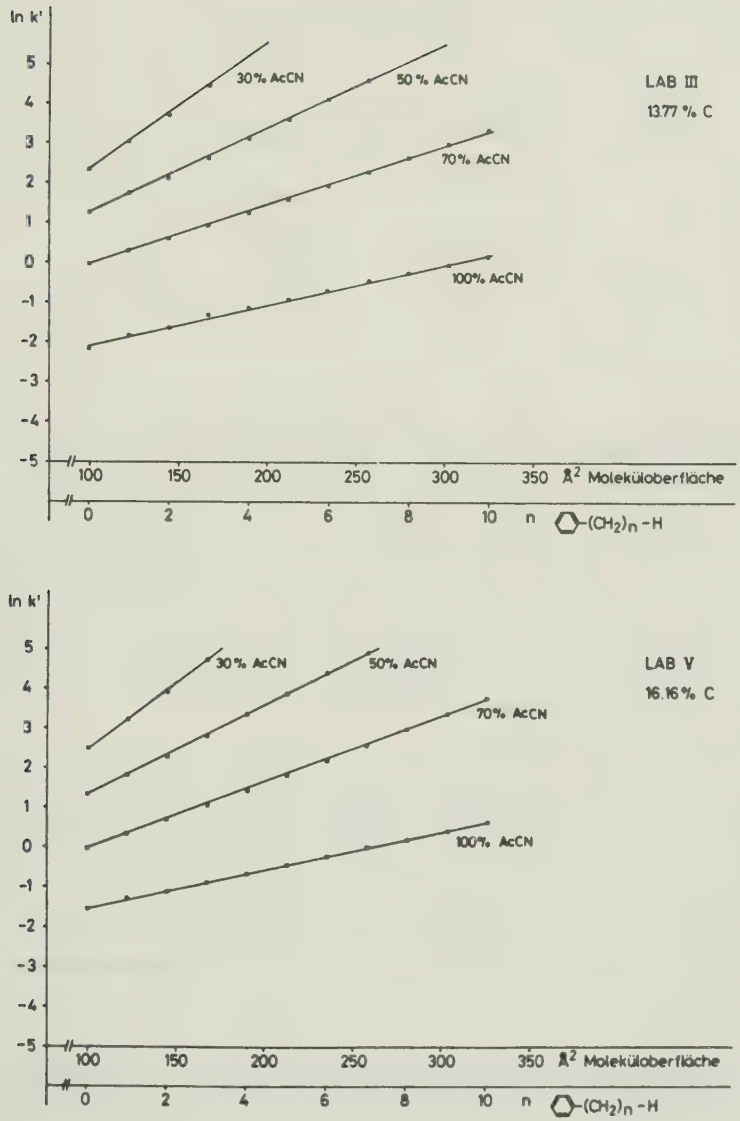


Abbildung 17: Retention der homologen Alkylbenzole: ln k' als Funktion der Moleküloberfläche bzw. Anzahl der Methylengruppen LAB III (13.77 % C) (Abb. 17c) und LAB II (16.16 % C) (Abb.17d)

Tabelle 17: Selektivität der homologen Alkylbenzole

	mobile Phase: Acetonitril - Wasser (v/v)			
	100 : 0	70 : 30	50 : 50	30 : 70
LAB VII	1.145	1.293	1.486	1.967
LAB II	1.177	1.325	1.547	2.003
LAB III	1.216	1.438	1.670	2.187
LAB V	1.248	1.493	1.718	2.346

Der Vergleich einer stationären Phase mit unterschiedlichen mobilen Phasen bereitet ähnliche Schwierigkeiten. Während sich die Selektivität zwischen 100 und 30 % Acetonitril in der mobilen Phase drastisch ändert, sind die Unterschiede der T_1-Zeiten nur sehr gering. Eine quantitative Beziehung zwischen Beweglichkeit und Selektivität als Funktion des Wassergehalts der mobilen Phase ist daher nicht gegeben. Wenn die Beweglichkeit der Alkylkette in einem unteren Grenzbereich liegt, bedingt eine geringe Änderung der Beweglichkeit eine große Veränderung des Retentionsverhaltens. Offensichtlich sind noch andere Faktoren außer der Beweglichkeit, wie z.B. die Löslichkeit in der mobilen Phase, für die Retention bestimmend.

Dennoch sind diese Untersuchungen sehr wertvoll für das Verständnis des chromatographischen Trennprozesses. Sie beweisen, daß die Alkylketten einer ODS-Phase ein dynamisches Verhalten zeigen, das von der Beladung und der Polarität der mobilen Phase abhängt. Das früher vorgeschlagene Bürstenmodell (20,67) wird dem tatsächlichen Verhalten in der Trennsäule nicht gerecht, denn die Alkylkette ist keine starre Stange, die an einem Ende auf die Oberfläche des Silicagels angebunden ist, sondern vielmehr eine flexible Kette.

Diese Kette kann in gut solvatisierenden Lösungsmitteln wie Hexan aufgerichtet sein, so daß das Bürstenmodell eine akzeptable Beschreibung darstellt. Von Wasser jedoch wird die unpolare ODS-Kette nicht benetzt, es kommt deshalb zu Aggregationen der Ketten untereinander. In dieser kollabierten Form dürfte eine Alkylkette unter typischen HPLC-Bedingungen vorliegen. Auch wenn in der mobilen Phase Methanol oder Acetonitril als weniger polare organische Komponente vorhanden ist, befinden sich die Alkylketten in

einem kollabierten Zustand und nicht in der Bürstenform, die wahrscheinlich erst im Kontakt mit völlig unpolaren Eluenten wie Hexan möglich wird (114).

Aber auch in der kollabierten Form sind Konformationsänderungen der Kette möglich, so daß ein Teil der Silanolgruppen der RP-Phase von den Alkylliganden nicht abgedeckt wird und zu Wechselwirkungen mit Eluent und Probe fähig ist.

4. SILANOPHILE WECHSELWIRKUNGEN

4.1. NMR-UNTERSUCHUNGEN

4.1.1. Allgemeines

Mit Hilfe von Suspensions-NMR-Relaxationsmessungen kann nicht nur, wie beschrieben, das dynamische Verhalten der Alkylketten, sondern auch die silanophile Wechselwirkung zwischen Probensubstanzen und stationärer Phase untersucht werden. Es wird angenommen, daß basische Substanzen in nicht näher definierter Weise mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten. In einer Suspension aus stationärer und mobiler Phase sowie der zu untersuchenden Base ist mit Hilfe von Relaxations-NMR-Experimenten die Adsorption einer basischen Verbindung über die Bestimmung ihrer Beweglichkeit meßbar. In den hier beschriebenen Untersuchungen werden ausschließlich Amine als Basen verwendet.

Da es gerätetechnisch nicht möglich war, die Wechselwirkung des basischen Stickstoffs über ^{15}N-NMR-Spektroskopie zu messen, wurde eine Veränderung der Beweglichkeit des Amins über ^{13}C-NMR-Relaxationsmessungen verfolgt. Ein Maß für die Adsorption eines Moleküls ist seine Beweglichkeit, die im Falle einer Adsorption eingeschränkt wird. Eine Änderung der Beweglichkeit einer Molekülgruppe läßt sich durch den Vergleich der Relaxationszeiten T_1 und der Halbwertsbreiten der Signale von freien und adsorbierten Spezies verfolgen.

Da das basische Molekül nicht als Ganzes an der stationären Phase fixiert wird, sondern über ein Adsorptionszentrum, wirkt sich die Einschränkung der Beweglichkeit natürlich am stärksten auf die Atomgruppen aus, die dem Adsorptionszentrum am nächsten sind. Mit zunehmender Entfernung vom Adsorptionszentrum wird sich die Beweglichkeit einer Atomgruppe wieder der in freier Lösung annähern. Für direkt am Stickstoff gebundene Kohlenstoffatome sollte der Meßeffekt also am größten sein.

Andererseits hängt die Beweglichkeit eines Atoms in einem Molekül natürlich auch von den Bewegungsfreiheitsgraden des Gesamtmoleküls ab. Ein Ringsystem ist starrer als ein offenkettiges System, Einfachbindungen erlauben mehr Beweglichkeit als Mehrfach-

bindungen. Ein möglichst großer Meßeffekt sollte sich demnach bei aliphatischen Aminen ergeben.

In aliphatischen Aminen besitzen Methylgruppen im Gegensatz zu Methylengruppen noch die Möglichkeit einer Rotation um eine C-C- bzw. C-N-Achse. Dieser zusätzliche Freiheitsgrad einer Wechselwirkung mit der Umgebung wird durch eine Adsorption an einem Nachbaratom B wenig beeinflußt. Die Unterschiede in den Relaxationszeiten von freien und adsorbierten Methylgruppen sollten daher kleiner sein als im Falle von Methylengruppen. Für eine Messung der Adsorption von Basen an stationären Phasen über ^{13}C-Relaxationsexperimente stellen Methylengruppen die besten Sensoren dar.

Um Probleme mit der Löslichkeit der zu untersuchenden Amine zu vermeiden, wurden ausschließlich bei Raumtemperatur flüssige und mit Acetonitril in allen Verhältnissen mischbare Amine der Suspension zugegeben. Zudem ist die Quantisierung dieser Amine durch einfaches Pipettieren mit großer Genauigkeit möglich. Die Suspensionslösung enthielt neben der stationären Phase und dem Amin in allen Fällen deuteriertes Acetonitril, wobei das Signal des Septetts der CD_3-Gruppe bei 0 ppm gleichzeitig als Referenzsignal für die chemische Verschiebung der übrigen Signale diente.

In chromatographischen Untersuchungen wird Triethylamin (TEA) der mobilen Phase mit der Begründung zugesetzt, das Tailing von Peaks zu reduzieren bzw. ganz zu unterdrücken, indem die Silanolgruppen durch TEA maskiert werden. TEA mit drei Methyl- und drei Methylengruppen ergibt ein einfaches NMR-Spektrum mit hoher Signalintensität und somit kurzer Meßzeit für ein Relaxationsexperiment. Durch eine unterschiedliche chemische Verschiebung von Methyl- und Methylengruppe des TEAs und den Hauptsignalen der ODS-Kette kommt es nur für das schwache Signal der terminalen Methylgruppe der ODS-Kette zu einer Signalüberlagerung.

Da TEA auch die oben diskutierten Anforderungen in Bezug auf zu erwartenden Meßeffekt und Löslichkeit erfüllt, wurde es in den ersten NMR-Experimenten als basisches Amin der Suspension aus CD_3CN und stationärer Phase zugesetzt.

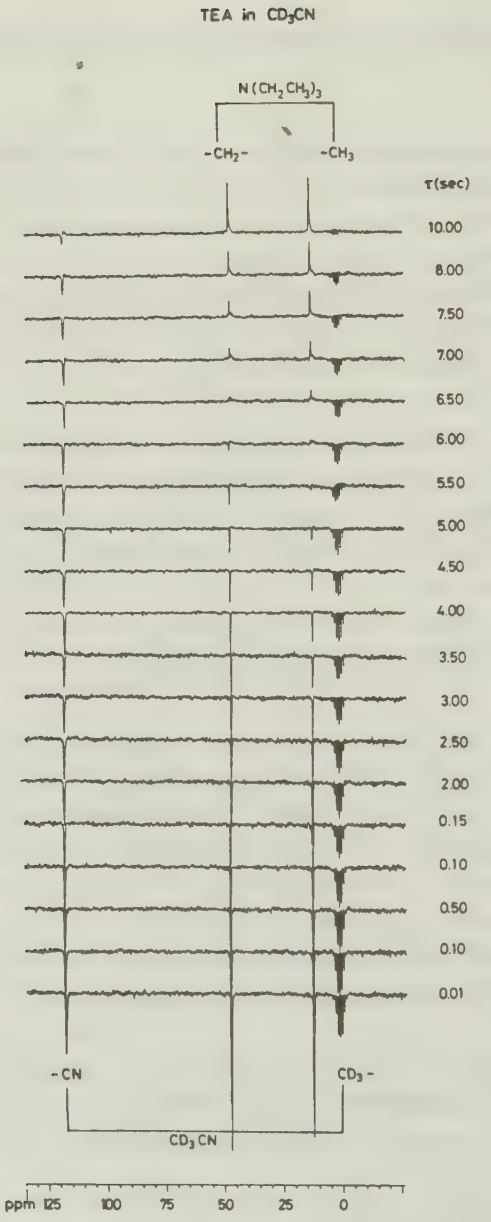


Abbildung 18: ^{13}C-Relaxationsmessung von TEA in CD_3CN-Lösung

Abbildung 18 zeigt die ^{13}C-Relaxationsmessung von freiem TEA in einer CD_3CN-Lösung. Die Halbwertsbreiten für das Methyl- und das Methylensignal liegen zwischen 7 und 7.4 Hz. Aus den Wartezeiten für den Nulldurchgang von 5.75 und 6.3 sec errechnet man Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 von 8 und 9 Sekunden für die Methyl- bzw. die Methylengruppe des TEA.

Um die Daten verschiedener Suspensionsmessungen miteinander vergleichen zu können, müssen die Suspensionen reproduzierbar hergestellt und unter gleichen Bedingungen vermessen werden. Das Gesamtsuspensionsvolumen wurde mit 2400 µl in allen Messungen konstant gehalten. Auch das Verhältnis der Menge an stationärer Phase zum Suspensionsvolumen sollte jeweils konstant sein. Viskositätsänderungen der Probe bei unterschiedlicher Zusammensetzung der Suspension wurden allerdings wegen der geringen Differenz der Viskositäten von Acetonitril (0.344 cp) (129) und TEA (0.368 cp) (130) vernachlässigt.

Adsorbierte Spezies können sich außer in ihren Relaxationszeiten auch in ihrer chemischen Verschiebung von freien Spezies der gleichen Art unterscheiden. Damit in der Suspensionslösung mit Sicherheit freie und adsorbierte TEA-Moleküle vorliegen, wurde die Menge an TEA so berechnet, daß, bezogen auf alle Silanolgruppen an der Oberfläche der stationären Phase, ein doppelter Überschuß an TEA zu Silanolgruppen in der Mischung vorhanden ist.

Abbildung 19 a zeigt die Relaxationsmessung der modifizierten Phase LAB III in einem Gemisch aus 2000 µl deuteriertem Acetonitril und 400 µl TEA.

Das Septett der CD_3-Gruppe bei 0 ppm und das Singulett der CN-Gruppe bei 118 ppm sowie die Resonanzen der Kohlenstoffatome C1 - C18 bei 15 - 30 ppm sind aus den Relaxationsmessungen aus Kapitel 3.2. bekannt. Zusätzlich zu diesen Signalen finden sich zwei weitere Resonanzen bei etwa 14 und 46 ppm, die der Methyl- und der Methylen- gruppe des TEAs zuzuordnen sind. Das Signal der Methylgruppe bei 14 ppm überdeckt teilweise das Signal des terminalen Kohlenstoffatoms C18, aber aufgrund der höheren Konzentration an TEA in der Suspension stört dies die Auswertung nicht.

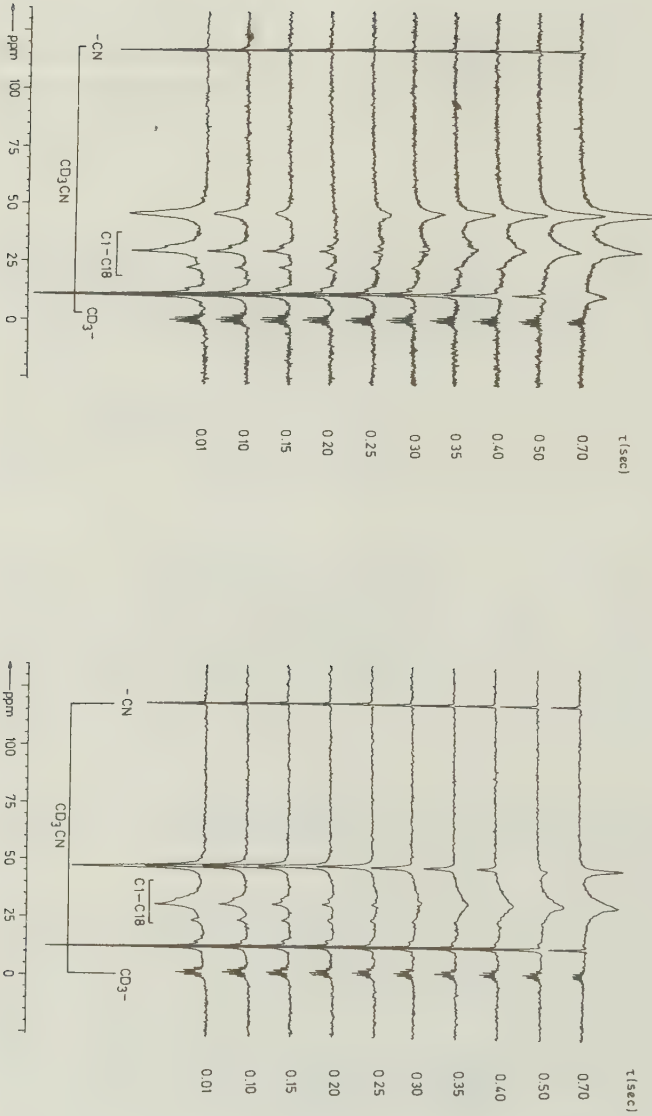


Abbildung 19: ^{13}C-Relaxationsmessung von Suspensionen von LAB III und LAB IIIe in einer Mischung aus TEA und CD_3CN

Der Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen freien und adsorbierten TEA-Molekülen reicht bei gegebener Spektrometerauflösung nicht aus, um zwischen beiden Spezies zu unterscheiden. Das Signal gibt deshalb die Summe adsorbierter und freier TEA-Moleküle an. Im Vergleich zu freiem TEA (siehe Abbildung 18) ist vor allem eine deutliche Erhöhung der Halbwertsbreite auf über 60 Hz und eine Wartezeit für den Nulldurchgang von 0.19 sec - entsprechend einer T_1-Zeit von 0.25 sec - für die Methylengruppe auffällig. Für die Methylgruppe sind die Veränderungen in den Relaxationszeiten nicht ganz so augenfällig wie bei der Methylengruppe, doch, wie die Analyse der Daten zeigt (Tabelle 19), ähnlich groß.

Diese Daten deuten auf eine Adsorption des TEA an der stationären Phase hin. Um zu untersuchen, ob die Adsorption tatsächlich an den Silanolgruppen und nicht doch an den Octadecylketten stattfindet, wurde das gleiche Experiment unter sonst gleichen Bedingungen mit den beiden stationären Phasen LAB V und LAB IIIe (Abbildung 19 b) wiederholt.

LAB III, LAB IIIe und LAB V wurden aus einem Batch Silicagel mit monofunktionellem Octadecylsilan unter gleichen Reaktionsbedingungen hergestellt. Diese Phasen unterscheiden sich im Kohlenstoffgehalt und damit in der Anzahl umgesetzter Silanolgruppen. Vergleicht man die absolute Zahl an umgesetzten Silanolgruppen pro Gramm Phase, so hat LAB III mit 0.573 mmol den geringsten Umsetzungsgrad, LAB IIIe mit 0.928 mmol den höchsten. LAB V liegt mit 0.673 mmol ODS-Ketten pro Gramm Phase zwischen diesen beiden Werten. Da LAB IIIe aber mit dem relativ leichten Trimethylsilylrest nachbehandelt wurde, ist die Menge an verbleibenden Silanolgruppen pro Gramm Phase bei LAB IIIe mit 2.600 µmol/g geringfügig kleiner als bei LAB V mit 2.582 µmol/g.

Der Berechnung dieser Werte wurde eine BET-Oberfläche von 410 m^2/g und eine Silanolgruppendichte von 4.8 $SiOH/nm^2$ zu Grunde gelegt. Tabelle 18 gibt die aus dem Kohlenstoffgehalt berechneten Mengen an Alkylliganden und Silanolgruppen der Phasen an.

Tabelle 18: Phasendaten von ODS-Phasen aus monofunktionellen Silanen

Phase	% C	mmol ODS	mmol TMS	Σ (ODS + TMS)	µmol SiOH/g
Silica	0.00	-	-	-	3.267
LAB III	13.77	0.573	-	0.573	2.683
LAB IIIe	15.03	0.573	0.350	0.928	2.600
LAB V	16.16	0.673	-	0.673	2.582

Für die ^{13}C-Relaxationsexperimente wurden je 700 mg stationäre Phase in 2000 µl CD_3CN und 400 µl TEA suspendiert. Tabelle 19 gibt die Ergebnisse wieder:

Tabelle 19: Relaxationsmessung von TEA in Suspensionen modifizierter stationärer Phase

Methylengruppe

Phase	ppm	t (sec)	T_1 (sec)	Δv/2 (Hz)	Δv/2 (CN) (Hz)
LAB III	47.1	0.19	0.250	66.2	10.3
LAB V	47.3	0.28	0.400	38.3	8.8
LAB IIIe	47.2	0.46	0.670	27.9	9.5
TEA	47.3	6.30	9.100	7.4	12.2

Methylgruppe

Phase	ppm	t (sec)	T_1 (sec)	Δv/2 (Hz)	Δv/2 (CN) (Hz)
LAB III	12.1	0.60	0.870	23.5	10.3
LAB V	12.6	0.70	1.000	17.1	8.8
LAB IIIe	12.5	> 0.70	> 1.000	11.8	9.5
TEA	12.5	5.75	8.300	7.0	12.2

Während sich die chemische Verschiebung innerhalb der Meßfehlergrenzen von 1.5 Hz nicht ändert, sind bei der Halbwertsbreite und der Wartezeit für den Nulldurchgang -

entsprechend also auch bei der T_1-Zeit - deutliche Unterschiede zu sehen. Die Phase LAB III mit der höchsten Anzahl an Silanolgruppen weist eine Halbwertsbreite von 66 bzw. 23 Hz für die Methylen- bzw. Methylgruppe auf. Gegenüber einer Halbwertsbreite von etwa 7 Hz - für beide Signale bei in Lösung vermessenem TEA - ist dies eine deutliche Signalverbreiterung. Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, ändern sich auch die Wartezeiten für den Nulldurchgang drastisch.

LAB V hat im Vergleich zu LAB III weniger freie Silanolgruppen. Da aber zu gleichen Mengen an stationärer Phase auch die gleiche Menge an TEA (jeweils 400 µl) zugegeben wurde, finden die TEA-Moleküle an LAB V weniger Adsorptionsplätze, im Mittel befinden sich mehr TEA-Moleküle im freien als im adsorbierten Zustand. Die Halbwertbreite ist deshalb mit 38 und 17 Hz geringer, die Wartezeit mit 0.28 bzw. 0.70 sec für den Nulldurchgang höher als bei LAB III.

Es ist interessant, die Ergebnisse der Phasen LAB III und LAB V, die nicht durch "endcapping" nachbehandelt wurden, mit der Phase LAB IIIe (Abbildung 19) zu vergleichen, die nachträglich mit Trimethylchlorsilan umgesetzt wurde. Obwohl die absolute Zahl an Silanolgruppen pro Gramm Phase bei beiden Phasen fast gleich ist, zeigen die Relaxationszeiten, daß sich in der Suspension mit LAB IIIe im Mittel weniger TEA-Moleküle im adsorbierten Zustand befinden. Die Halbwertsbreite ist mit 28 Hz für die Methylengruppe relativ gering, die Wartezeit für den Nulldurchgang mit 0.46 sec fast doppelt so groß wie für LAB V.

Dieses Ergebnis ist nur so zu interpretieren, daß von den Silanolgruppen auf LAB IIIe ein größerer Anteil als auf LAB V für die TEA-Moleküle nicht zugänglich ist. Offensichtlich werden durch die Kombination von ODS- und TMS-Gruppen mehr Silanolgruppen abgeschirmt als bei einer Modifizierung nur mit Octadecylketten.

Die Relaxationsexperimente an modifizierten stationären Phasen belegen, daß basische Moleküle an den zugänglichen Silanolgruppen adsorbiert werden. Eine Adsorption findet auch bei der nachbehandelten Phase LAB IIIe statt, bei der alle mit chemischen Mitteln umsetzbaren Silanolgruppen reagiert haben. Dies bedeutet, daß alle stationären Phasen auf Kieselgelbasis freie und für basische Moleküle zugängliche polare Silanolgruppen an ihrer Oberfläche besitzen.

4.1.2. Einfluß der Menge an TEA in der Suspensionslösung auf die Relaxation

Um den Einfluß der Menge an TEA auf die Relaxation zu untersuchen, wurde Nucleosil in CD_3CN/TEA-Mischungen suspendiert und vermessen. Unmodifiziertes Silicagel besitzt die größtmögliche Anzahl an Silanolgruppen und somit die meisten Adsorptionszentren für TEA-Moleküle. Weiterhin stören keine hydrophoben Wechselwirkungen und die Zugänglichkeit der Silanolgruppen wird nicht durch den Platzbedarf von Alkylketten behindert.

Es wurden insgesamt 6 Suspensionen mit 200, 400, 600, 1000, 2000 und 2200 µl TEA und der jeweils zum Endvolumen der Suspension von 2400 µl zu ergänzenden Menge an CD_3CN vermessen. In jeder Suspension befanden sich 600 mg Nucleosil 7-100 (II) als stationäre Phase. Diese Menge unmodifizierter Phase entspricht etwa 700 mg modifizierter Phase, die in den oben beschriebenen Experimenten eingewogen wurde, berichtigt um die Gewichtszunahme durch die Modifizierung. Ein Vergleich der Werte, die mit der Suspension von unmodifiziertem Silicagel mit 400 µl TEA erhalten wurden, mit den Ergebnissen für die modifizierte Phase LAB III zeigt, daß beide Phasen im Rahmen der Meßgenauigkeit eine etwa gleiche Anzahl an für TEA zugänglichen Silanolgruppen aufweisen. Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der Messungen im Überblick:

Tabelle 20: Einfluß der Menge an TEA auf die Relaxation an unmodifizierten Phasen

	Methylengruppe				
Menge TEA	ppm	t (sec)	T_1 (sec)	Δν/2 (Hz)	Δν/2 (CN) (Hz)
200	46.3	0.10	0.140	101	7.5
400	46.7	0.17	0.250	64	10.0
600	46.7	0.22	0.320	56	8.5
1000	47.1	0.27	0.390	51.5	9.0
2000	48.4	0.33	0.480	10.3	5.9
2200	48.8	0.55	0.790	16.2	11.0
TEA	47.3	6.30	9.100	7.4	12.2

Fortsetzung Tabelle 20:

Methylgruppe

Menge TEA	ppm	t (sec)	T_1 (sec)	$\Delta\nu/2$ (Hz)	$\Delta\nu/2$ (CN) (Hz)
200	11.5	0.40	0.580	25	7.5
400	11.8	0.48	0.690	20	10.0
600	11.8	> 0.50	> 0.720	19	8.5
1000	12.3	0.65	0.940	17.6	9.0
2000	13.8	> 0.70	> 1.000	5.8	5.9
2200	14.2	> 0.70	> 1.000	8.8	11.0
TEA	12.5	5.75	8.300	7.0	12.2

Auch in dieser Reihe findet sich wieder die gleiche Systematik wie in den Experimenten mit den modifizierten Phasen bei konstanter Aminmenge. Mit zunehmender Aminkonzentration in der Suspension werden die Wartezeiten für den Nulldurchgang und die T_1-Zeiten größer, die Halbwertsbreiten nehmen ab. Sind nur wenige TEA-Moleküle in der Suspension vorhanden, wird ein großer Anteil davon an der stationären Phase adsorbiert. Im Mittel sind weniger Moleküle frei in Lösung, die Relaxationszeiten sind klein. Da die Zahl der Adsorptionsplätze konstant ist, sind bei einer Erhöhung der Aminkonzentration in der Suspension mehr TEA-Moleküle frei, die Relaxationszeiten nähern sich denen, die in Lösung gemessen werden.

Während die Wartezeiten für den Nulldurchgang mit steigender Aminkonzentration ebenfalls ansteigen, nehmen die Halbwertsbreiten für die Methyl- und die Methylengruppe bis zu einer Aminkonzentration von 2000 µl ab, um dann bei 2200 µl TEA in der Suspension wieder leicht anzusteigen. Die beiden Suspensionen mit 2000 und 2200 µl TEA in einem Gesamtvolumen von 2400 µl sind eigentlich Suspensionen von Nucleosil in TEA. Bezogen auf die vorhandenen Silanolgruppen (etwa 1.96 µmol) ist etwa die sieben- bis achtfache molare Menge an TEA in diesen Suspensionen vorhanden. Die Halbwertsbreiten liegen in der gleichen Größenordung wie die des freien TEAs. Die Unterschiede in den Halbwertsbreiten der beiden Suspensionen sind auf die Auflösung des NMR-Spektrometers während der einzelnen Messungen zurückzuführen, die über die Halbwertsbreite des CN-Signals kontrolliert werden kann. Sie schwankte bei den einzelnen Messungen zwischen 5.9 und 12.2 Hz. Bei der Messung mit 2000 µl TEA war die

Spektrometerauflösung mit 5.9 Hz am besten, bei der Messung der Suspension mit 2200 µl TEA betrug die Halbwertsbreite des CN-Signals nur 11 Hz. Innerhalb der Meßfehlergrenzen sind deshalb diese beiden Werte gleich. Für die übrigen vier Messungen war die Halbwertsbreite des CN-Signals mit 8.8 bis 10.3 Hz in einem engen Bereich, so daß der Vergleich der Meßdaten sowie die obige Interpretation berechtigt sind.

4.1.3. Adsorption von TEA an verschiedenen Silicagelen

Da das chromatographische Verhalten von modifizierten Phasen vor allem bei der Trennung basischer Substanzen große Abweichungen zeigt, wurde das Verhalten von TEA auf zwei unterschiedlichen Silicagelen untersucht. Es standen Nucleosil 7-100 und Hypersil zur Verfügung. Da die ^{13}C-NMR-Messungen an einem 200 MHz Gerät mit einem wide-bore-Meßkopf durchgeführt wurden, mußte das Suspensionsvolumen verdoppelt werden. Von Nucleosil und Hypersil wurden je 1200 mg in 4000 µl CD_3CN und 800 µl TEA suspendiert. Wie schon in Kap. 3.1 beschrieben, hat die Magnetfeldstärke einen Einfluß auf die T_1-Zeiten. Da das Verhalten der beiden Basissilicagele Nucleosil und Hypersil gegenüber TEA bei einer Magnetfeldstärke von 4.7 Tesla untersucht wurde, sind die Wartezeiten für den Nulldurchgang etwa doppelt so groß wie bei einer Messung bei 2.1 Tesla. Abbildung 20 zeigt die dabei erhaltenen Spektren, in Tabelle 21 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Die T_1-Werte in Klammern wurden mit Hilfe eines Regressionsprogramm aus der Gesamtmagnetisierung Mz über alle Messungen gemittelt bestimmt. Abbildung 21 zeigt die resultiernden Kurven des Rechenprogramms. Die Verwendung des Rechenprogramms war in diesem Fall möglich, da insgesamt 20 Wartezeiten von 0.01 bis 5 sec gemessen wurden. Bei einer Wartezeit von 5 Sekunden erhält man den Wert für die vollständige Relaxation, der für eine exakte T_1-Berechnung notwendig ist. Bei den Experimenten mit verschiedenen stationären Phasen und verschiedenen Aminkonzentrationen war die längste Wartezeit immer noch zu kurz für eine vollständige Relaxation der Methyl- und der Methylengruppe. Deshalb wurde in diesen Fällen die T_1-Zeit aus der Wartezeit des Nulldurchgangs bestimmt.

Tabelle 21: Relaxation von TEA an Nucleosil und Hypersil

	Methylengruppe			
Menge TEA	ppm	t (sec)	T_1 (sec)	$\Delta\nu/2$ (Hz)
Nucleosil	49.9	0.35 (0.566)	0.505	52.5
Hypersil	47.2	0.10 (0.165)	0.144	38.5

	Methylgruppe			
Menge TEA	ppm	t (sec)	T_1 (sec)	$\Delta\nu/2$ (Hz)
Nucleosil	11.85	- (2.000)	-	19.5
Hypersil	12.23	1.4 (0.242)	0.202	26.2

Beim Vergleich von Nucleosil mit Hypersil ist auffällig, daß Hypersil eine etwa zweieinhalbmal kleinere T_1-Relaxationszeit aufweist als Nucleosil. Dies bedeutet, daß TEA-Moleküle auf Hypersil wesentlich mehr Adsorptionsplätze finden als auf Nucleosil, da die eingewogene Menge an stationärer Phase und die Aminkonzentration in beiden Fällen gleich sind. Ein so deutlicher Unterschied für die Adsorption von Basen an stationären Phasen erklärt auch ein unterschiedliches chromatographisches Verhalten.

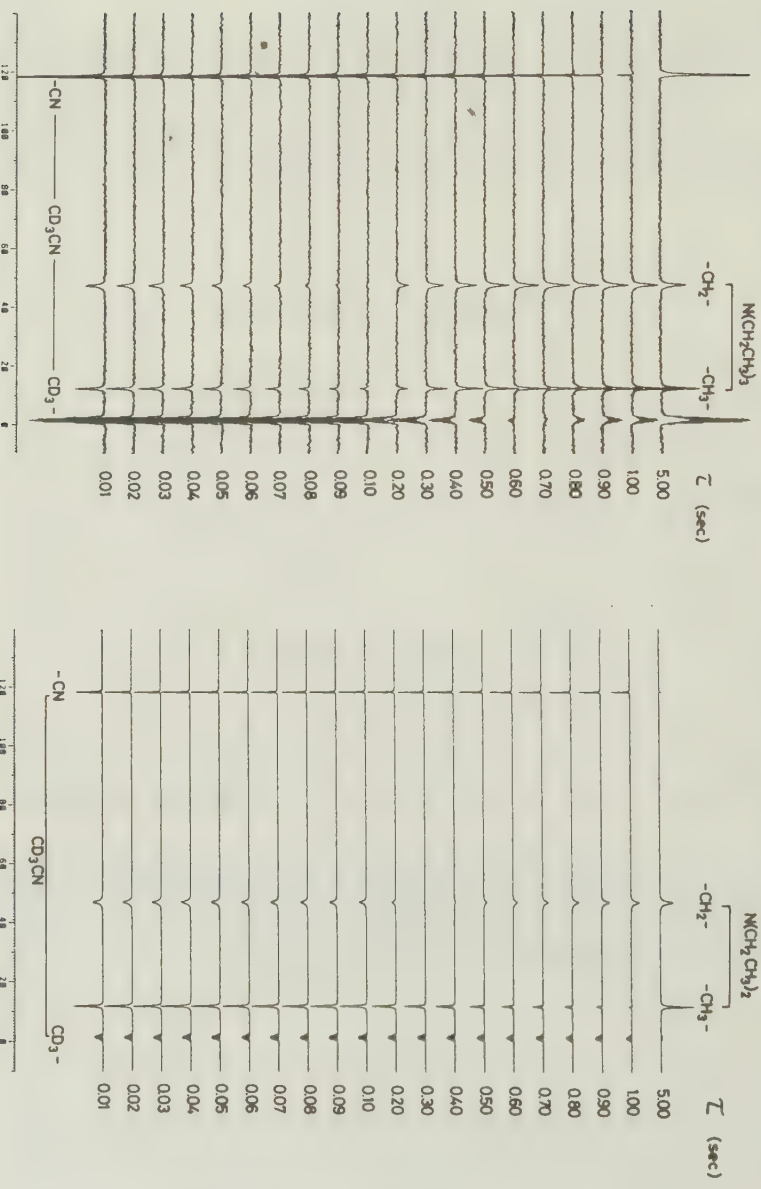


Abbildung 20: Adsorption von TEA an Nucleosil und Hypersil
^{13}C-Suspensions-NMR-Messung in TEA und CD_3CN

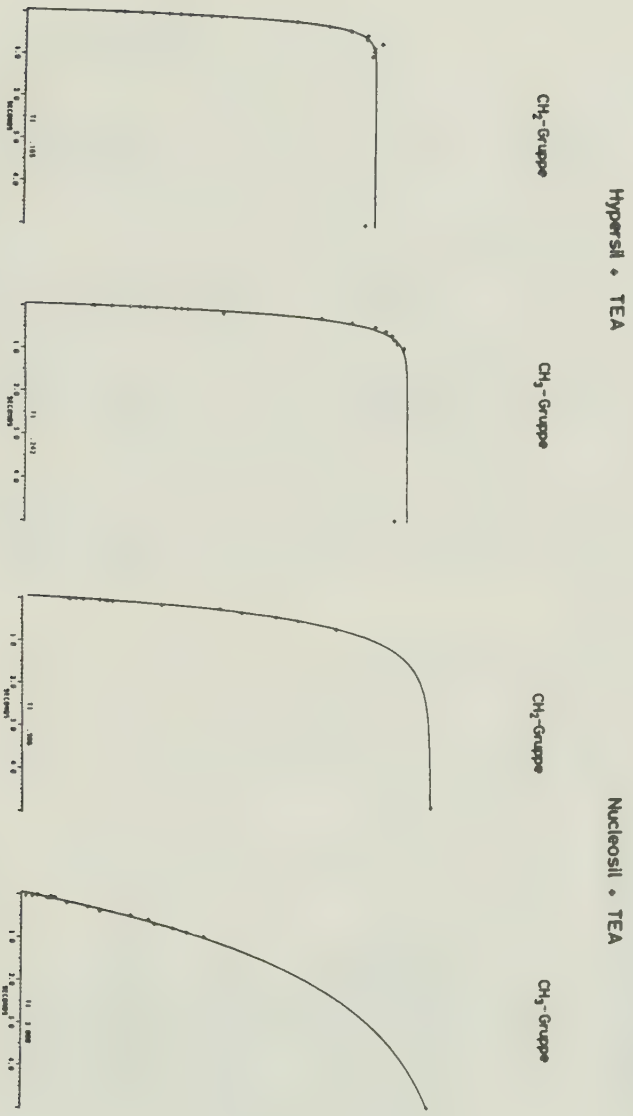


Abbildung 21: Relaxation der Methylen- und der Methylgruppe von TEA in einer Suspension von Hypersil bzw. Nucleosil und TEA/CD_3CN

4.1.4 Adsorption anderer basischer Moleküle an Nucleosil

Ebenso wie mit TEA läßt sich in Suspensionsmessungen auch die Adsorption anderer basischer Moleküle zeigen. Abbildung 22 gibt die NMR-Spektren von n-Octylamin in Lösung und in Suspension mit Nucleosil wieder. An diesem Beispiel sieht man sehr deutlich den Einfluß der Entfernung vom Adsorptionszentrum auf die Relaxation. Während in Lösung die Halbwertsbreiten aller Kohlenstoffatome des Octylamins etwa 7 Hz betragen, ist im adsorbierten Zustand das C1-Atom mit einer Halbwertsbreite von 137 Hz deutlich verbreitert. Das terminale Kohlenstoffatom hat eine Halbwertsbreite von 8 Hz, was der in Lösung gemessenen entspricht. Die Signale der Kohlenstoffatome C2 und C3 sind so breit, daß sie den Untergrund der Signale für C4/C5 und C6 bilden und nicht aufgelöst werden. Die Halbwertsbreiten der Signale C4/C5 und C6 sind in Klammern angegeben, da sie nur aus dem Spektrum abgeschätzt werden konnten.

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Relaxationsmessung von n-Octylamin, suspendiert in CD_3CN und Nucleosil, mit einer NMR-Messung von freiem n-Octylamin in CD_3CN zusammengestellt.

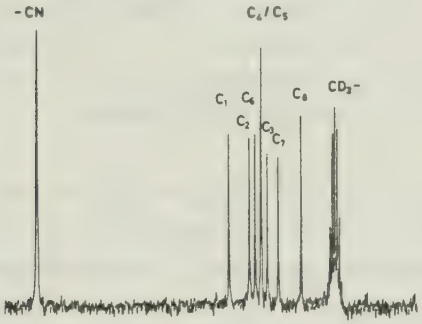
Tabelle 22: Relaxation von n-Octylamin

	n-Octylamin frei		n-Octylamin adsorbiert			
	ppm	Δν/2	ppm	Δν/2	t(sec)	T_1
C1	43.20	~7	40.6	137	0.20	0.289
C2	35.06	~7	-	-	-	-
C3	27.88	~7	-	-	-	-
C4	30.30	~7	30.47	(70)	0.32	0.462
C5	30.30	~7	30.47	(70)	0.32	0.462
C6	32.80	~7	32.87	(60)	0.42	0.606
C7	23.55	~7	23.57	16	0.60	0.866
C8	14.55	~7	14.52	8	0.85	1.226

Octylamin in CD_3CN

$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$

1 2 3 4 5 6 7 8



Nucleosil suspendiert in Octylamin und CD_3CN

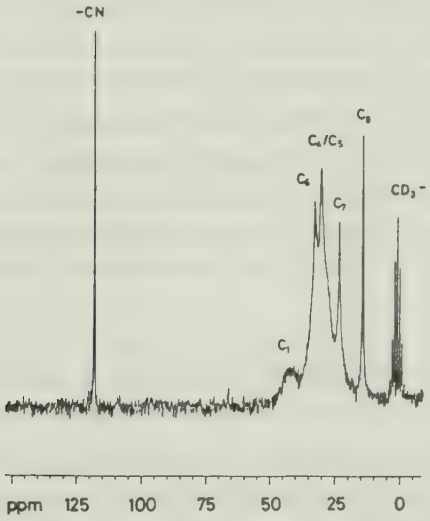


Abbildung 22: ^{13}C-NMR-Spektren von Octylamin in Lösung und in Suspension

Ziel der Chromatographie ist die Trennung eines Stoffgemischs in seine Einzelsubstanzen, die durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen der Probenmoleküle mit der stationären Phase erreicht wird. Wie in den oben diskutierten Beispielen sichtbar wird, können mit NMR-Techniken Adsorptionen von Basen an stationären Phasen über Silanolgruppen nachgewiesen werden. Es sollte deshalb auch möglich sein, in einem NMR-Meßkopf mit Suspensionsmessungen die unterschiedliche Adsorption verschiedener Probensubstanzen nachzuweisen und so in das Geschehen in einer Chromatographiesäule während der Trennung Einblick zugewinnen.

Mit einer Suspension aus Nucleosil, CD_3CN sowie den drei aromatischen Aminen Anilin (A), N-Methylanilin (MA) und N,N-Dimethylanilin (DMA) (Formeln und NMR-Zuordnung siehe Abbildung 23) wurde eine ^{13}C-Relaxationsmessung durchgeführt.

In diesem Fall wurden relativ komplexe Verbindungen gewählt, da das gleiche System auch mit chromatographischen Mitteln untersucht wurde. Dazu jedoch wurden UV-aktive Probensubstanzen benötigt.

In einer Suspension aus Nucleosil und 2000 µl CD_3CN wurde je 133 µl Anilin, N-Methylanilin und N,N-Dimethylanilin gelöst. Anilin hat vier Kohlenstoffatome mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung, die beiden anderen je fünf. Zusammen mit den Signalen für CD_3CN ergibt sich hieraus ein komplexes Spektrum, wie in Abbildung 23 zu sehen ist. In Tabelle 23 ist die chemische Verschiebung der einzelnen Kohlenstoffatome aufgelistet. Die unter Suspensionsbedingungen gemessenen Werte sind den aus Literaturinkrementen berechnten Verschiebungen (131) gegenübergestellt. Die Zuordnung der einzelnen C-Atome sowie die Kurzbezeichnungen der Amine sind aus der Abbildung 23 ersichtlich.

In Tabelle 24 sind die Wartezeiten für den Nulldurchgang und die daraus berechneten T_1-Werte zusammengestellt. Die dem vermuteten Adsorptionszentrum am nächsten liegenden Kohlenstoffatome C1 lassen keinen Unterschied in den T_1-Zeiten erkennen. Allerdings sind die Signale dieses quartären Kohlenstoffs wegen des fehlenden NOE-Effekts sehr gering. Das C4-Atom ist nur für das DMA eindeutig zuzuordnen, die chemischen Verschiebungen des C4-Atoms von A und MA überlagern mit der CN-Gruppe des CD_3CN. Die C3-Atome aller drei Verbindungen sind wegen der gleichen

chemischen Verschiebung auch nicht aussagekräftig für die unterschiedliche Adsorption der Aniline an der stationären Phase.

Tabelle 23: Chemische Verschiebung von Anilin, N-Methylanilin undN,N-Dimethylanilin in einer Suspension aus Nucleosil und CD_3CN

	Anilin		N-Methylanilin		N,N-Dimethylanilin	
	ppm		ppm		ppm	
	gem.	ber.	gem.	ber.	gem.	ber.
C1	148.7	148.6	149.9	149.9	151.0	151.6
C2	113.2	115.8	110.3	112.3	113.9	113.8
C3	130.1	130.2	130.1	129.3	130.1	130.0
C4	118.5	118.6	-	116.9	117.6	117.6
$N-CH_3$	-	-	30.2	30.8	41.0	40.9

Lediglich die C2-Atome haben für alle drei Verbindungen unterschiedliche chemische Verschiebungen und unterschiedliche Wartezeiten für den Nulldurchgang, also auch unterschiedliche T_1-Relaxationszeiten. Anilin weist nach einer Wartezeit von 1.2 sec einen Nulldurchgang für das C2-Atom auf, N-Methylanilin nach 1.3 und N,N- Dimethylanilin nach 1.6 sec. Dies bedeutet, daß Anilin am stärksten an der Phase adsorbiert ist, N,N-Dimethylanilin am schwächsten. Für die beiden methylierten Substanzen deutet auch die Beweglichkeit der N-Methylgruppe auf die stärkere Adsorption des kleineren N-Methylanilins.

Für die Chromatographie bedeutet dies, daß mit Acetonitril als mobiler Phase zuerst N,N-Dimethylanilin, dann N-Methylanilin und zuletzt erst Anilin eluiert werden müßte.

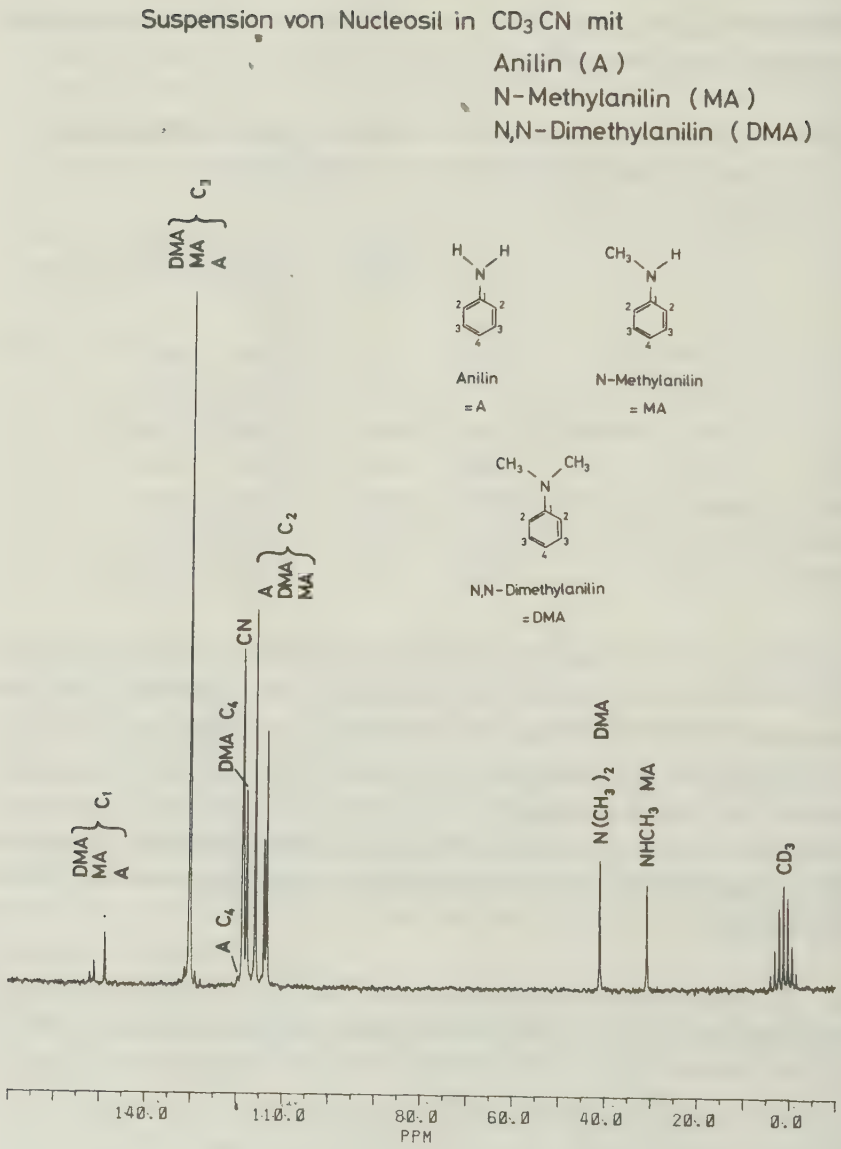


Abbildung 23: Ausschnitt aus einer ^{13}C-Relaxationsmessungsreihe mit Nucleosil, Anilin, N-Methylanilin und N,N-Dimethylanilin in CD_3CN

Tabelle 24: Relaxationszeiten von Anilin, N-Methylanilin und N,N-Dimethylanilin in einer Suspension aus Nucleosil und CD_3CN

	Anilin		N-Methylanilin		N,N-Dimethylanilin	
	t(sec)	T_1 (sec)	t (sec)	T_1 (sec)	t (sec)	T_1 (sec)
C1	1.75	2.52	1.75	2.52	1.75	2.52
C2	1.20	1.73	1.30	1.88	1.60	2.31
C3	1.35	1.95	1.35	1.95	1.35	1.95
C4	-	-	-	-	1.20	1.73
$N-CH_3$	-	-	1.50	2.16	1.60	2.31

4.2. HPLC - UNTERSUCHUNGEN

4.2.1. Adsorption an Silicagel

In Kap. 4.1. wurden die NMR-Untersuchungen an dem System aus Nucleosil, CD_3CN und drei aromatischen Aminen beschrieben. Es ist möglich, dieses System direkt auf chromatographische Bedingungen zu übertragen und dann spektroskopische und chromatographische Ergebnisse miteinander zu vergleichen.

Um den Einfluß der Silanolgruppen auf chromatographische Trennungen zu zeigen, wurde eine stationäre Phase mit maximaler Konzentration an Silanolgruppen, nicht modifiziertes Silicagel, unter reversed-phase-Bedingungen eingesetzt. Da an der Oberfläche dieser stationären Phase keine Alkylliganden vorhanden sind, sind hydrophobe Wechselwirkungen ausgeschlossen, die Trennung von Probenmolekülen beruht auf der unterschiedlichen Wechselwirkung mit den einzigen Oberflächenspezies der stationären Phase, den Silanolgruppen. Wie in dem NMR-Experiment wurde Acetonitril als mobile Phase verwendet, daneben aber auch Mischungen aus Acetonitril und Wasser. Die drei

aromatischen Amine Anilin, N-Methylanilin und N,N-Dimethylanilin, die im NMR- und im HPLC-System als Probensubstanzen verwendet wurden, sind einerseits durch ihren basischen Charakter zu silanophilen Wechselwirkungen befähigt und andererseits durch ihre starke UV-Absorption bei 254 nm gut detektierbar.

Abbildung 24 zeigt die Chromatogramme, die mit 100% Acetonitril, Acetonitril-Wasser-Mischungen (70:30, 50:50 und 30:70 v/v) und reinem Wasser auf der Silicagelsäule erhalten wurden. Mit Acetonitril als mobiler Phase wird Anilin erst nach N,N-Dimethylanilin und N-Methylanilin eluiert. Die N-substituierten Amine werden bei der Injektion des Gemischs nicht getrennt, aber durch die Retentionszeiten der Einzelkomponenten kann nachgewiesen werden, daß N,N-Dimethylanilin vor N-Methylanilin und Anilin eluiert wird. Mit einer Mischung von Acetonitril-Wasser (70:30) können die drei Aniline chromatographisch in diesem System nicht getrennt werden. Erhöht man den Wassergehalt der mobilen Phase weiter, kommt es zu einer Elutionsumkehr. Mit 50 % Wasseranteil wird N,N-Dimethylanilin stärker als die beiden anderen Aniline retardiert, ab 70 % Wassergehalt in der mobilen Phase werden die drei Substanzen in der Elutionsreihenfolge Anilin, N-Methylanilin und N,N-Dimethylanilin getrennt. Mit reinem Wasser als mobiler Phase wird N,N-Dimethylanilin so stark an der stationären Phase adsorbiert, daß eine Elution nicht möglich ist. Der N-Methylanilinpeak erscheint erst nach über 30 min und mit starkem Tailing, während Anilin nur sehr wenig retardiert wird.

Setzt man der mobilen Phase 0.1% TEA zu, werden bei allen untersuchten Zusammensetzungen der mobilen Phase die drei Aniline mit der Totzeit, d.h. ohne Retention, eluiert. Dieses Experiment läßt den Schluß zu, daß die TEA-Moleküle der mobilen Phase die Silanolgruppen auf der stationären Phase blockieren, die dadurch als Adsorptionszentren für die Probensubstanzen entfallen.

Die Retention der Aniline an Silicagel mit mobilen Phasen ohne Basenzusatz wird von der Zugänglichkeit der Silanolgruppen für die Aniline und der Löslichkeit der Aniline in der mobilen Phase bestimmt. In reinem Acetonitril wird das kleine unsubstituierte Anilin am stärksten retardiert, da es mit einer größeren Anzahl von Silanolgruppen wechselwirken kann. Steigt der Wassergehalt der mobilen Phase jedoch über 50 %, ist die Löslichkeit der Aniline in dem Eluenten für ihre Retention entscheidend. Die Löslichkeit der drei Aniline in reinem Wasser ist proportional zu ihren Retentionszeiten. Bei hohen Wassergehalten der mobilen Phase ist die Adsorption an den Silanolgruppen nicht mehr vollständig reversibel und die Aufenthaltsdauer an der stationären Phase nimmt zu.

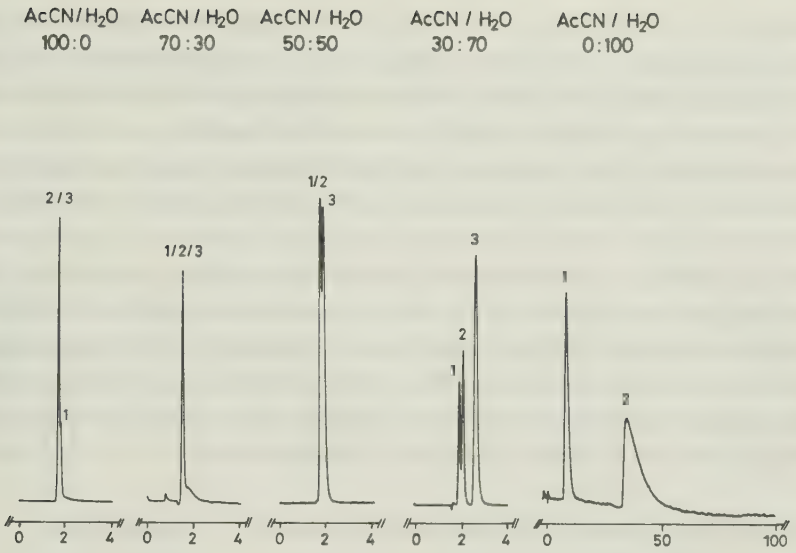


Abbildung 24: Trennung von Anilin, N-Methylanilin und N,N-Dimethylanilin auf einer Nucleosil-Säule unter reversed-phase-Bedingungen, Fluß 1 ml/min, Detektion UV 254 nm, 1= Anilin, 2 = n-Methylanilin, 3 = N,N-Dimethylanilin

Dieses Beispiel zeigt zum einen den Einfluß von Silanolgruppen auf die Trennung von Basen unter reversed-phase-Bedingungen und zum anderen, wie diese Wechselwirkungen durch den Zusatz einer Base zur mobilen Phase unterdrückt werden können. Wenn ein aliphatisches Amin die Silanolgruppen der stationären Phase über eine Adsorption am Stickstoff blockiert, weisen die Alkylgruppen des Amins von der Oberfläche des Silicagels weg. Damit sind hydrophobe Wechselwirkungen der Alkylgruppen des Amins mit hydrophoben Probensubstanzen möglich.

Im Fall des TEAs als Base in der mobilen Phase ist wegen des kurzen zweiatomigen Alkylspacers die resultierende hydrophobe Oberfläche der Silicagelphase zu klein für eine meßbare Retention. Verwendet man jedoch längerkettige Amine, kann man damit eine Kieselgelphase "umpolen". Das Silicagel wird über die silanophilen Wechselwirkungen von SiOH-Gruppen und basischem Stickstoff mit dem Amin reversibel beladen. Man erhält somit eine dynamische RP-Phase. Um eine möglichst hohe Beladung zu be-

kommen, sollte die Konzentration an Amin in der mobilen Phase möglichst hoch sein. Bei längerkettigen Aminen wie Octadecylamin ist jedoch die Löslichkeit in Acetonitril mit 3 g/l gering (132), in Wasser ist Octadecylamin praktisch unlöslich. Wegen der vergleichsweise geringen Beladung der stationären Phase mit Amin muß für die Chromatographie der Wassergehalt der mobilen Phase hoch sein, um eine Retention zu beobachten. Octadecylamin eignet sich daher nicht als Aminzusatz in der mobilen Phase.

Vom kürzerkettigen n-Octylamin lösen sich bei Raumtemperatur 2.5 ml in einem Liter Wasser (133). Deshalb wurde Nucleosil mit einer mobilen Phase aus Acetonitril-Wasser-n-Octylamin (30:70:0.15) bzw. Wasser-n-Octylamin (98.5:1.5) belegt und die hydrophoben Eigenschaften dieser Phase anhand der Trennung von aromatischen Aminosäuren und Pyridinderivaten untersucht. Tabelle 25 gibt die mit dem System Nucleosil-Wasser-Octylamin erhaltenen Retentionsdaten wieder.

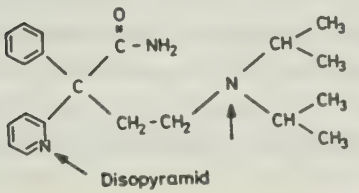
Tabelle 25: Retentionsdaten für aromatische Aminosäuren und Pyridinderivate auf Nucleosil

Name	k'	Name	k'
Picolin	0.86	Phenylalanin	1.68
Lutidin	3.04	Tyrosin	2.42
Collidin	5.68	Tryphtophan	4.51

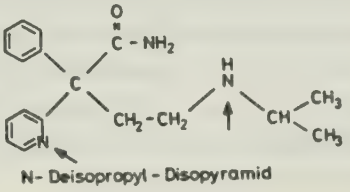
Auch in diesem Fall ist die Retention von der Größe des Probenmoleküls abhängig. Das Trennprinzip beruht allerdings nicht wie mit reinen Silicasäulen auf der Wechselwirkung mit Silanolgruppen, denn die drei getesteten aromatischen Aminosäuren besitzen keine basischen Zentren und werden nur über die Wechselwirkung ihrer hydrophoben Oberfläche mit den Alkylgruppen des Amins getrennt. Daß Octylamin auf der stationären Phase adsorbiert wird, konnte mit NMR-Suspensionmessungen bewiesen werden (siehe Kap. 4.1.)

4.2.2. Adsorption an RP-Phasen

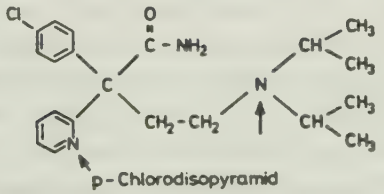
Die Adsorption basischer Moleküle an stationären RP-Phasen ist nicht nur im statischen NMR-Meßsystem aufzeigbar, sondern auch mit chromatographischen Methoden, dort jedoch meist als unerwünschtes Ergebnis beweisbar. Zur Untersuchung von Adsorptionsphänomenen basischer Probensubstanzen an stationären RP-Phasen auf Kieselgelbasis mit chromatographischen Methoden diente ein Trennproblem aus der Praxis der klinischen Chemie. Das an Herzinfarktpatienten verabreichte Antiarrhythmikum Disopyramid, dessen Konzentration im Serum wegen der geringen therapeutischen Wirkbreite ständig überwacht werden muß, sowie der Primärmetabolit Deisopropyldisopyramid und das bei der Aufarbeitung der Serumproben als interner Standard hinzugesetzte p-Chlorodisopyramid sollten durch ein HPLC-Trennsystem schnell und quantitativ bestimmt werden.



Disopyramid



N- Deisopropyl - Disopyramid



p - Chlorodisopyramid

Als mobile Phase zur Trennung dieser drei Wirksubstanzen diente ein isokratisches Gemisch aus Acetonitril, Wasser und Essigsäure (50:50:1, v/v/v), dem gegebenenfalls zwischen 50 und 2500 ppm Amin zugesetzt wurden. Es wurden insgesamt sechs verschiedene stationäre Phasen eingesetzt, von denen fünf kommerziell erhältlich sind (Hypersil ODS 5 µ, Spherisorb ODS 2 5 µ, Lichrospher CH-18, Zorbax ODS und Nucleosil 5 C18). Als sechste stationäre Phase wurde LAB V, ein im Hause ODS-modifiziertes Nucleosil, verwendet.

Wie aus den Formeln zu ersehen ist, besitzen alle drei Probenmoleküle basische Zentren, die in dem Schema mit einem Pfeil markiert sind: ein Pyridinstickstoff sowie ein tri- bzw. disubstituierter Aminstickstoff. Über diese beiden basischen Zentren sind Wechselwirkungen mit Silanolgruppen möglich.

4.2.2.1. Reversibilität der TEA-Adsorption an der RP-Phase

In den ersten Versuchen, Disopyramid vom Metaboliten und dem internen Standard zu trennen, wurden Spherisorb ODS 2 und Hypersil ODS als stationäre Phase eingesetzt. Mit der mobilen Phase, die nur aus Acetonitril, Wasser und Essigsäure zusammengesetzt war und keinen Aminzusatz enthielt, wurden an diesen beiden stationären Phasen alle drei Substanzen irreversibel adsorbiert - der k'-Wert war also $+\infty$. Wenn der mobilen Phase jedoch nur 1000 ppm TEA (1ml/l) zugesetzt werden, kann das Trenngemisch mit endlichen k'-Werten und a-Werten besser als 1.5 gut aufgetrennt werden. Die Peaks sind allerdings breiter als die neutralen Substanzpeaks eines Testgemischs, und die Effizienz der Säule ist mit etwa 1000 theoretischen Böden vergleichsweise schlecht. Testet man die gleiche Säule mit einem Testgemisch aus Alkylbenzolen, so findet man für Toluol etwa 4000 bis 5000 theoretische Böden.

Es zeigte sich, daß der Effekt, den die Zugabe von TEA bewirkte, vollständig reversibel ist. Dieses Verhalten wurde an beiden stationären Phasen, Spherisorb ODS 2 und Hypersil ODS, bei acht verschiedenen Aminkonzentrationen zwischen 50 und 2500 ppm überprüft. Sobald bei einer gegebenen Aminkonzentration A die Unterschiede in den Retentionszeiten bei drei aufeinanderfolgenden Injektionen weniger als 0.5 % betrugen, das System also ausreichend äquilibriert war, wurde mit 50 ml mobiler Phase ohne Aminzusatz gespült. Wenn nun die gleiche Probenmenge injiziert wurde, konnte wiederum aufgrund der irreversiblen Adsorption des Trenngemischs kein Peak beobachtet werden. Erneutes Spülen mit 50 ml TEA-haltiger mobiler Phase A ergab nach der Injektion des gleichen Trenngemischs Retentionszeiten, die sich um weniger als 1 % von denen der im ersten Zyklus ermittelten unterschieden.

Je nachdem, ob eine Säule mit oder ohne Aminzusatz in der mobilen Phase betrieben wurde, war nach etwa 15 bis 20 Säulenvolumina das Gesamtsystem äquilibriert. Auch nach einem mehrmonatigen Dauerbetrieb zeigten sich an den stationären Phasen keine

irreversiblen Effekte.

4.2.2.2. Theoretische Beschreibung der Aminadsorption an RP-Phasen

Bei der graphischen Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, daß der ermittelte k'-Wert in einem hyperbolischen Zusammenhang mit der Aminkonzentration in der mobilen Phase steht (siehe Abbildung 25a). Ist in der mobilen Phase kein Amin zugegen, geht der k'-Wert als Folge der irreversiblen Adsorption gegen $+\infty$, ist dagegen die Aminkonzentration sehr groß, so eluieren die Substanzen schon kurz nach dem Totvolumen.

Es wird hier postuliert, daß Amine in der mobilen Phase zu einer reversiblen Blockade der Silanolgruppen von RP-Phasen fähig sind. Der Vorgang der Adsorption und Desorption eines Amins an bzw. von der Oberfläche der stationären Phase im dynamischen System einer Chromatographiesäule ist formal beschreibbar wie die Adsorption eines Gases an einer Oberfläche nach Langmuir (133).

Die Voraussetzungen zur Ableitung einer Adsorptionsisotherme nach Langmuir - übertragen auf das vorliegende Beispiel - sind:

es gibt Adsorptionstellen an der stationären Phase - die SiOH-Gruppen

alle Silanolgruppen sind gleich reaktiv, d.h. die Adsorption eines basischen Zentrums ist für alle SiOH-Gruppen gleich wahrscheinlich

es gibt keine Wechselwirkungen zwischen den Adsorptionsstellen. Eine Adsorption hängt nicht von der Besetzung oder Nichtbesetzung von Adsorptionszentren in der Nachbarschaft ab.

jede Adsorptionstelle kann nur maximal ein Molekül binden (Bildung einer monomolekularen Schicht)

für jede Konzentration c der basischen Komponente in der mobilen Phase stellt sich bei konstanter Temperatur ein Gleichgewicht zwischen der Anzahl der besetzten Silanolgruppen O und der freien Silanolgruppen (1-O) ein

Das Adsorptionsgleichgewicht läßt sich aus einer kinetischen Betrachtung der Adsorption und Desorption ableiten. Die Desorption muß der Zahl an besetzten Adsorptionszentren, also O proportional sein. Der Proportionalitätsfaktor ist die Desorptionskonstante k_{dm} (im folgenden bezeichnen die Indices a und d Adsoptions- und Desorptionsvorgang, m und s stehen für zur Adsorption fähige Moleküle aus der mobilen Phase bzw. aus dem Trenngemisch).

$$14) \quad v_{dm} = k_{dm} * O$$

Die Adsorption wiederum ist der Anzahl der freien Silanolgruppen und der Stoßhäufigkeit, also dem relativen Anteil an Amin in der mobilen Phase proportional.

$$15) \quad v_{am} = k_{am} * c_m * (1-O)$$

Im Gleichgewicht ist Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeit gleich groß:

$$16) \quad k_{dm} * O = k_{am} * c_m * (1-O)$$

Für O bzw. für (1-O) ergibt sich:

$$17a) \quad O = \frac{k_{am} * c_m}{k_{dm} + k_{am} * c_m} = \frac{b * c_m}{1 + b * c_m}$$

$$17b) \quad (1 - O) = \frac{1}{1 + b * c_m} \quad \text{mit } b = k_{am}/k_{dm}$$

Gleichung 17b) gibt also die Anzahl der freien Silanolgruppen in Abhängigkeit vom Adsorptionskoeffizienten b und dem relativen Anteil an Amin in der mobilen Phase c_m an.

Durch den Zusatz eines Amins in die mobile Phase wird ein quasistationärer Zustand mit einem definierten Anteil von freien und blockierten Silanolgruppen geschaffen. Die Zahl der freien Silanolgruppen ist in einem System mit einem Amin in der mobilen Phase gegenüber einem aminfreien System reduziert.

Für den Zusammenhang zwischen dem k'-Wert und der thermodynamischen Beschreibung der Retention gilt:

$$18) \quad k' = \emptyset K_x \quad \text{bzw.} \quad \emptyset \frac{k_{ds}}{k_{as}}$$

für die Adsorption einer Substanz s an die Silanolgruppen der stationären Phase. Ø ist das Phasenverhältnis, der Quotient aus Oberfläche bzw. Volumen der stationären Phase und dem Volumen der mobilen Phase.

Durch die Injektion eines Trenngemischs mit basischen Komponenten wird in einem bestimmten Volumenelement die Zahl der zur Adsorption fähigen Moleküle erhöht. Da die Adsorptionszentren der stationären Phase jedoch schon zu einem bestimmten Bruchteil besetzt sind, müssen die basischen Komponenten des Trenngemischs um die noch freien Silanolgruppen konkurrieren. Man kann diesen Vorgang formal genauso wie die Belegung durch die aminhaltige mobile Phase beschreiben:

$$19) \quad v_{as} = k_{as} * c_s * ((1 - O) - \Pi)$$

$$20) \quad v_{ds} = k_{ds} * \Pi$$

mit $1 - O$ = Anzahl freier Silanolgruppen nach der Äquilibrierung mit dem Amin der mobile Phase

Π = von basischen Komponenten des Trenngemischs besetzte Silanolgruppen

s = solute (basische Moleküle im Trenngemisch)

Die Gleichgewichtsbedingung $v_{as} = v_{ds}$ ergibt:

$$21) \quad k_{ds} * \Pi = k_{as} * c_s * ((1 - O) - \Pi)$$

$$22) \quad \frac{k_{ds}}{k_{as}} = \frac{c_s}{\Pi + \Pi * b * c_m} - c_s$$

Nach Einsetzen in Gleichung 18) erhält man:

$$23) \quad k' = \Ø * \left(\frac{c_s}{\Pi + \Pi * b * c_m} - c_s \right)$$

Aus Gleichung 23) sind folgende Zusammenhänge ersichtlich:

$$24) \quad k' \sim 1/c_m$$

$$25) \quad k' \sim c_s$$

$$26) \quad k' \sim 1/b \qquad \text{mit } b = f(pK_b, \text{Größe,usw})$$

Die theoretische Ableitung des Zusammenhangs zwischen der Retention einer Base an Silanolgruppen von RP-Phasen und der Aminkonzentration in der mobilen Phase sagt also voraus, daß die Retention umgekehrt proportional zum Aminanteil in der mobilen Phase (in ppm) ist, proportional zur injizierten Menge an Base im Trenngemisch und umgekehrt proportional zur Adsorptionskonstante b des Amins in der mobilen Phase. Die Adsorptionkonstante b sollte eine Funktion der Basizität und der Größe des Amins sein, da durch die Alkylgruppen der RP-Phase nicht alle Silanolgruppen gleich gut zugänglich sind.

Die Schlußfolgerungen dieser Ableitung sollen nun anhand des oben beschriebenen Trennsystems des Antiarrhythmikums Disopyramid aufgezeigt werden. Dazu wurden mit Ausnahme der Zusammensetzung der mobilen Phase aus Acetonitril, Wasser und Essigsäure (50:50:1) (v/v/v) alle chromatographischen Parameter systematisch geändert. Neben der Menge an Base im Injektionsvolumen wurde die stationäre Phase und die Konzentration des Amins in der mobilen Phase variiert. Aber auch das in die mobile Phase zugegebene Amin wurde verändert, um den Einfluß der Größe des Amins und der Basenkonstante auf eine Adsorption an Silanolgruppen zu beobachten. Da die Zusammensetzung der mobilen Phase bis auf ppm-Zugaben des Amins immer konstant blieb, wird angenommen, daß sich das Phasenverhältnis Ø nicht ändert.

4.2.2.3. Retention als Funktion der Menge an Base im Trenngemisch

Abbildung 25 a zeigt die k'-Werte von p-Chlorodisopyramid, Disopyramid und Deisopropyldisopyramid als Funktion der Aminkonzentration der mobilen Phase. Die Aminkonzentration der mobilen Phase variiert zwischen 50 und 2500 ppm, die k'-Werte wurden bei 9 verschiedenen Aminkonzentrationen bestimmt.

In allen drei Fällen ergibt sich bei graphischer Auftragung eine Hyperbel unterschiedlicher Steilheit, die Anpassung der Meßpunkte an die Kurve ist mit Korrelationskoeffizienten von jeweils ≥0.99 sehr gut. Eine Hyperbel ist mathematisch durch die Formel $y = a * x^b$ beschrieben, wobei a und b Konstanten sind. Im vorliegenden Fall ergibt das Programm zur Anpassung an hyperbolische Kurven die Koeffizienten b zu -0.96, -0.82 und -0.77 für die drei Testsubstanzen. Aus der theoretischen Ableitung errechnet sich ein Exponent von - 1, aber durch die Streuung der Meßpunkte und die Ungenauigkeit des Programms bei nur neun Werten stimmt die hyperbolische Kurvenanpassung nicht mit dem theoretischen Wert überein.

Trägt man jedoch k'-Werte gegen die reziproke Aminkonzentration auf, wie in Abbildung 25 b gezeigt, erhält man Geraden unterschiedlicher Steigung. Eine solche Auftragung impliziert einen Exponenten von - 1, wie in der Theorie gefordert. Da eine Kurvenanpassung an eine Gerade ungleich weniger Rechenaufwand bei gleichzeitig höherer Genauigkeit erfordert, ist eine solche Auftragung auch rechnerisch einfacher zu bewältigen. Die Korrelationskoeffizienten betragen in diesen Fällen 0.998 und besser. Dies bedeutet, daß die Meßpunkte sehr genau die theoretischen Voraussagen bestätigen.

In den folgenden Abbildungen dieses Kapitels sind deshalb immer nur die k'-Werte gegen die reziproke Aminkonzentration aufgetragen. Wegen der Überschneidungen der Geraden erschien es auch nicht sinnvoll, die Werte aller drei basischen Probensubstanzen einzuzeichnen. Stellvertretend für die beiden anderen Substanzen wurden nur die für Disopyramid ermittelten Retentionsdaten in die Abbildungen mitaufgenommen. Die Retentions- und Selektivitätsdaten für p-Chlorodisopyramid und Deisopropyldisopyramid sind in den Tabellen enthalten. Auch die genaue Gleichung für die Kurvenanpassungen sowie die Korrelationskoeffizienten sind in Tabellen zusammengefaßt.

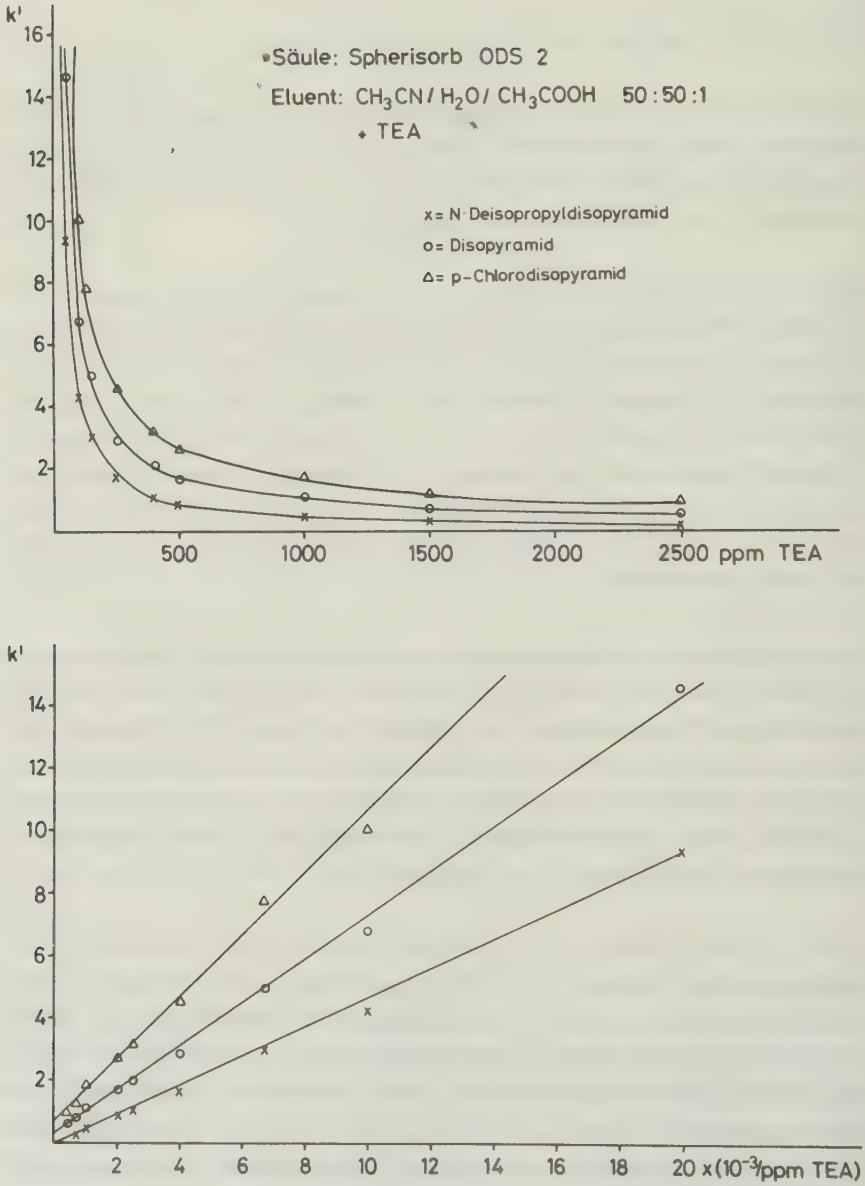


Abbildung 25: Retention von Disopyramid, Deisopropyldisopyramid und p-Chlorodisopyramid als Funktion der TEA-Konzentration der mobilen Phase a) als Funktion von ppm TEA, b) als Funktion von 1/ppm TEA

Tabelle 26: Retention von Deisopropyldisopyramid, Disopyramid und p-Chloro-disopyramid als Funktion der injizierten Menge an Base

	stationäre Phase							
	Hypersil ODS				Spherisorb ODS 2			
ppm TEA	3 * 1 µg		3* 10 µg		3 * 1 µg		3 * 10 µg	
	k'	a	k'	a	k'	a	k'	a
2500	0.40	1.673	0.23	2.469	0.31	2.028	0.21	2.710
	0.67	1.457	0.57	1.671	0.62	1.630	0.56	1.741
	0.97		0.96		1.01		0.98	
1500	0.62	1.616	0.41	2.088	0.48	2.018	0.31	2.504
	1.01	1.424	0.86	1.630	0.96	1.576	0.77	1.631
	1.43		1.41		1.51		1.25	
1000	0.77	1.604	0.68	1.883	0.78	1.872	0.51	2.166
	1.23	1.418	1.28	1.599	1.45	1.535	1.11	1.612
	1.75		2.05		2.23		1.81	
500	1.44	1.558	1.34	1.724	1.61	1.777	0.87	1.948
	2.25	1.397	2.31	1.552	2.87	1.499	1.69	1.591
	3.14		3.59		4.30		2.69	
400	2.00	1.533	-	-	2.17	1.756	1.08	1.879
	3.07	1.381	-	-	3.82	1.489	2.02	1.599
	4.23		-		5.69		3.15	
250	3.14	1.528	2.50	1.649	3.38	1.743	1.67	1.738
	4.80	1.373	4.12	1.538	5.89	1.486	2.90	1.562
	6.59		6.34		8.76		4.53	
150	5.21	1.509	4.17	1.569	5.69	1.723	3.00	1.667
	7.86	1.362	6.54	1.524	9.80	1.469	5.00	1.565
	10.71		9.96		14.40		7.82	
100	-	-	5.43	1.547	-	-	4.29	1.583
	-	-	8.40	1.522	-	-	6.79	1.484
	-		12.78		-		10.07	

Fortsetzung Tabelle 26:

	12.75	1.479	8.86	1.551	13.75	1.666	9.43	1.457
50	18.86	1.361	13.73	1.510	22.91	1.455	14.63	1.403
	25,67		20.74		33.34		20.52	

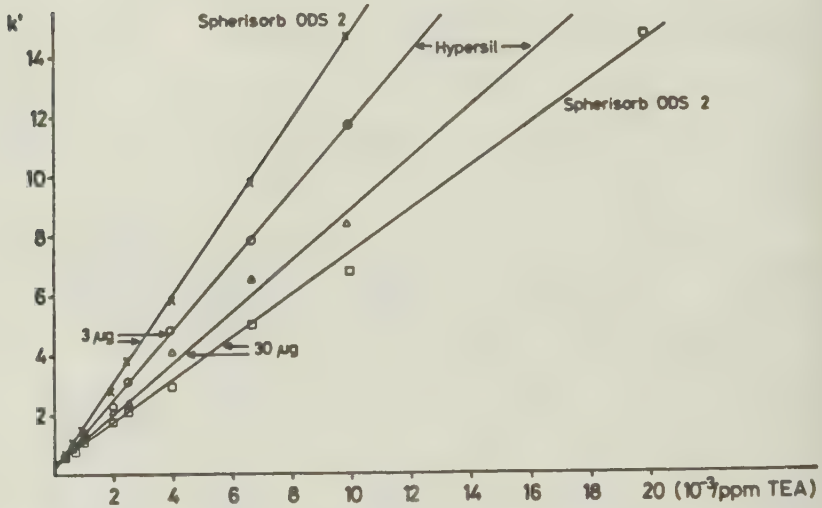


Abbildung 26: Retention von Disopyramid als Funktion der eingespritzten Probenmenge und der TEA-Konzentration der mobilen Phase

Gleichung 24 sagt eine Abhängigkeit des Retentionsverhaltens von der Menge der zur Adsorption fähigen Moleküle im Injektionsvolumen voraus. In Abbildung 26 und Tabelle 26 sind die Ergebnisse der Messungen an den beiden stationären Phasen Hypersil ODS und Spherisorb ODS 2 mit zwei verschieden konzentrierten Probenlösungen dargestellt. Eine Probe enthielt 3 mal 1 µg jeder Substanz, eine zweite war zehnfach konzentrierter mit dreimal 10 µg Substanz, jeweils absolut in 10 µl Injektionsvolumen.

Die bei einer Aminkonzentration der mobilen Phase ermittelten k'-Werte und a-Werte der drei Testsubstanzen sind in Dreierblöcke zusammengefaßt, wobei der erste k'-Wert für die Retention von N-Deisopropyldisopyramid, der zweite für Disopyramid und der dritte für p-Chlorodisopyramid stehen. Wenn eine geringe Anzahl Probenmoleküle um eine konstante Anzahl freier Silanol- gruppen konkurriert, so werden im Mittel viele Probenmoleküle eine Adsorptionsstelle besetzen. Die resultierende Retention ist daher

groß. Ist die Zahl der Probenmoleküle größer, so werden sie sich im Mittel weniger lange an den Silanolgruppen aufhalten, da deren Zahl konstant ist und mehr Probenmoleküle nicht adsorbiert werden können. Dies impliziert allerdings eine weitgehende Sättigung der Adsorptionszentren.

4.2.2.4. Abschätzung der Silanolkonzentration durch chromatographische Messungen

An dieser Stelle soll eine Abschätzung der molaren Mengen von Amin in der mobilen Phase, der Silanolgruppen auf der stationären Phase und der Probenmoleküle im Injektionsvolumen vorgenommen werden.

Eine stationäre Phase wie Hypersil ODS wird durch Modifizierung eines Silicagels von etwa 180 m^2 BET-Oberfläche hergestellt. Bei einer NMR-spektroskopisch mit CF_3COOD ermittelten Silanolgruppendichte von 7.3 µmol/m^2 ergibt sich eine Gesamtkonzentration von 1.3 mmol SiOH pro Gramm Phase. Da bei der Modifizierung maximal 50 % aller Silanolgruppen umgesetzt werden, beträgt die minimale Zahl an SiOH-Gruppen nach der Modifizierung etwa 0.65 mmol SiOH/g.

Die Säulen, die in dieser Untersuchung verwendet wurden, sind bei einem Durchmesser von 4.6 mm 125 mm lang. In einer Säule befinden sich etwa 1.6 g stationäre Phase mit etwa 1 mmol Silanolgruppen. Für andere Packungsmaterialien, die andere Oberflächen und Packungsdichten aufweisen, ergibt sich eine Absolutmenge an Silanolgruppen in der gleichen Größenordung.

Die mobile Phase enthält pro Liter zwischen 50 und 2500 µl Amin. Bei einem Totvolumen von 1.5 ml und einer Äquilibrierungszeit von 30 min bei einem Fluß von 1 ml/min (Äquilibrierung mit 20 Totvolumina) gelangen zwischen 1.5 und 75 µl Amin auf die mobile Phase. TEA hat eine Dichte von 0.726 g/ml und ein Molekulargewicht von 101.19 g; 1.5 bzw. 75 µl sind demnach 10 bzw. 500 nmol.

Unter der Annahme, daß während der Äquilibrierungszeit alle TEA-Moleküle, die auf die stationäre Phase gelangen, adsorbiert werden, ist das molare Verhältnis von Amin zu Silanolgruppen maximal 500 nmol zu 1 mmol, also 1:2000. Obwohl diese Abschätzung

recht grob ist, ist der Wert für die Silanolgruppen sicher eher zu klein und der für die Zahl der TEA-Moleküle eher zu groß. Trotz dieser Voraussetzungen ist in dem System dasVerhältnis TEA-Moleküle zu SiOH-Gruppen 1:2000 oder noch geringer.

Andererseits zeigen die chromatographischen Untersuchungen, daß bei einer Aminkonzentration von 2500 ppm die überwiegende Mehrzahl der chromatographisch wirksamen Silanolgruppen durch das Amin in der mobilen Phase blockiert ist. Bei einer so hohen Aminkonzentration zeigen die Testsubstanzen nur eine sehr geringe Retention.

Bei einer spektroskopischen Bestimmung der SiOH-Dichte, wie sie der obigen Abschätzung zugrunde liegt, werden alle Silanolgruppen unabhängig von ihrer Zugänglichkeit während einer Trennung erfaßt. Die obige Abschätzung zeigt aber, daß mehr als 99.9 % aller Silanolgruppen selbst von kleinen Molekülen nicht erreicht werden und deshalb bei der Wechselwirkung stationäre Phase - Trenngemisch keine Rolle spielen. Die Abschirmung des Großteils aller Silanolgruppen wird durch die sterische Ausdehnung der Kohlenstoffliganden erreicht, die zum einen aufgrund ihrer Länge das Porenvolumen und damit die Oberfläche des Silicagels verkleinern, zum anderen auch wegen ihres Platzbedarfs senkrecht zur Silicageloberfläche den Zugang zu Silanolgruppen in der Nachbarschaft zur Bindungsstelle be- und verhindern.

An Probe wurde zwischen 3 und 30 µg in 10 µl injiziert. Bei einem Molekulargewicht von rund 300 g/mol beträgt also die absolute Menge/Injektion zwischen 10 und 100 nmol. Wie man sieht, liegt die molare Menge im Testgemisch etwa in der gleichen Größenordnung wie die für das Amin abgeschätzte. Da man vermuten kann, daß auch der Adsorptionskoeffizient b für das Amin der mobilen Phase und der der Basen des Testgemischs in etwa ähnlich sind, resultiert die bei der Ableitung der Adsorptionsisotherme postulierte Konkurrenzsituation zwischen Basen im Trenngemisch und in der mobilen Phase. Die Silanolgruppen unterscheiden nicht zwischen ihnen. Wenn jedoch die Mehrzahl der zugänglichen Silanolgruppen durch vorheriges Äquilibrieren mit Amin besetzt ist, finden Basen im Trenngemisch keine Adsorptionsstellen mehr und werden in endlicher Zeit eluiert.

Da der Trennmechanismus jedoch nicht auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, sondern durch ionische Kräfte oder aufgrund von Wasserstoffbrückenbildung verursacht wird, ist die Effizienz der Säulen schlecht. Je mehr die Retention auf silanophilen Wechselwirkungen beruht, umso mehr kommt es zu Tailing.

Während Peaks mit k'-Werten von 0 bis 5 noch gut auswertbar sind und die mit ihnen berechneten Bodenzahlen zwischen 500 und 1000 Böden pro Säule liegen, zeigen die länger retardierten Peaks so starkes Tailing, daß die Halbwertsbreiten im Bereich von mehreren Minuten liegen und die Bodenzahlen oft unter 100. Leider läßt sich dies nicht qualitativ durch einen Vergleich der k'-Werte mit den Asymmetriefaktoren zeigen, da die verwendeten Integratorprogramme bei Asymmetriefaktoren über 10 nicht mehr zuverlässig arbeiten.

4.2.2.5. Retention als Funktion von Größe und Basizität des Amins in der mobilen Phase

Um zu untersuchen, in welchem Maße Eigenschaften des Amins die Adsorption an Silanolgruppen beeinflussen, wurde bei sonst gleichen Trennbedingungen das zur mobilen Phase zugesetzte Amin variiert. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde als stationäre Phase Spherisorb ODS 2 verwendet, es wurden jeweils 10 µl mit 30 µg Probensubstanz injiziert. Für jede Versuchsreihe wurden die Retentionsdaten für 9 verschiedene Aminkonzentrationen von 50, 100, 150, 250, 400, 500, 1000, 1500 und 2500 ppm bestimmt.

Tabelle 27 gibt einen Überblick über einige wichtige Daten der verwendeten Amine (135).

Tabelle 27: Eigenschaften einiger Alkylamine

Name	Formel	MG	pK_b	Dichte
Triethylamin	$(CH_3CH2)_3N$	101.19 g	3.25	0.728
n-Butylamin	$CH_3CH_2CH_2CH_2NH_2$	73.14 g	3.25	0.741
iso-Butylamin	$(CH_3)_2CHCH_2NH_2$	73.14 g	3.56	0.735
tert.-Butylamin	$(CH_3)_3CNH_2$	73.14 g	3.17	0.696
Piperidin	$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH$	85.15 g	3.00	0.861
N-Methylmorpholin	$CH_2CH_2OCH_2CH_2NCH_3$	101.15 g	6.59	0.905
n-Octylamin	$CH_3(CH_2)_7NH_2$	129.25 g	3.43	0.782

Eine Abschätzung der Größe eines Aminmoleküls gestaltet sich sehr schwierig, da keine Informationen über Bindungswinkel, Bindungslängen und Konfiguration im adsorbierten Zustand zu erhalten sind. Eine Möglichkeit ist die Berechnung des mittleren Flächenbedarf A_m eines Moleküls nach der Methode von Emmett und Brunauer (136):

$$27) \quad Am = \frac{f * M^{2/3} * 10^{14}}{N_L * d} \text{ nm2/Molekül}$$

mit f = Packungsfaktor, der sich bei einer dichtesten Anordnung mit 12 nächsten Nachbarn auf der Grenzfläche zu 1.081 ergibt

d = Dichte der Base in g/ml

M = Molekulargewicht in g/mol

N_L = Loschmidt-Zahl $6.023 * 10^{23}$

Eine zweite Möglichkeit, den Flächenbedarf eines Moleküls abzuschätzen, besteht in einer Berechnung nach Molekülmodellen. Hierzu wurden die Bindungsabstände C-C (154 pm) und C-H (109 pm), der Tetraederwinkel sowie der Kovalenzradius eines Wasserstoffatoms (120 pm) verwendet (133). Mit Hilfe eines Molekülmodells des Amins wurde die Konfiguration gewählt, die einerseits eine Adsorption über das freie Elektronenpaar des Stickstoffs ermöglicht und andererseits in Richtung auf das Adsorptionszentrum die geringste Ausdehnung aufweist. Diese Ausdehnung (veranschaulicht: der Schatten, den das Amin auf die Adsorptionsstelle wirft) wurde nun aus obigen Angaben geometrisch berechnet.

In Tabelle 28 sind die mit diesem Verfahren (BE-Verfahren) berechneten mittleren Größen der Butylamine und des TEAs wiedergegeben. Die Unterschiede zwischen den drei isomeren Butylaminen sind nicht besonders groß, da der Flächenbedarf aus Dichte und Molekulargewicht eines kugelförmigen Moleküls errechnet wird. Dieses Modell einer kugelförmigen Molekülgestalt, das eventuell für das tert.-Butylamin zutreffend ist, ist für iso-Butyl- und besonders für n-Butylamin sicherlich nicht anwendbar.

Tabelle 28: Abschätzung des Flächenbedarfs eines Amins

Name	BE-Verfahren nm^2/ Molekül	geometrisch nm^2/Molekül
n-Butylamin	0.324	0.23
iso-Butylamin	0.325	0.33
tert.-Butylamin	0.337	0.39
TEA	0.407	0.41

Die Werte, die mit dem Molekülmodell ermittelt wurden, zeigen eine größere Variationsbreite als die der BE-Methode. n-Butylamin mit einer, wenn auch kurzen, Alkylkette muß natürlich den gleichen Platzbedarf wie die ODS-Kette, nämlich 0.23 bis 0.27 nm^2, aufweisen. Der Platzbedarf der Isobutylgruppe ist mit 0.33 nm^2 zwischen dem der n-Butylgruppe und dem der tert.-Butylgruppe (0.39 nm^2). Die Größenordnung und die relativen Unterschiede liegen im Erwartungsbereich, obwohl sowohl Modell als auch Rechenmethode nur grobe Annäherungen darstellen. TEA hat nach diesen Berechnungen den größten Platzbedarf mit 0.41 nm^2 pro Molekül. Im Fall des TEAs entsprechen sich die Werte beider Methoden, da das Molekül eine annähernd kugelförmige Gestalt annehmen kann.

Für die Berechnung der Geradengleichungen wurden die Retentionsdaten, die für eine Aminkonzentration von 50 ppm ermittelt wurden, nicht berücksichtigt. Diese Werte liegen in fast allen Fällen deutlich unter dem Erwartungswert, der sich aus der Kurvenanpassung der übrigen acht Aminkonzentrationen errechnen läßt. Bei nur 50 ppm in der mobilen Phase sind so viele Silanolgruppen der stationären Phase nicht blockiert, daß die k'-Werte der zu trennenden Basen sehr groß werden. Die Retentionszeiten liegen zwischen 20 und 50 min. Da bei isokratischen Bedingungen bei so langen Analysenzeiten die Diffusion den Peak stark verbreitert, muß etwa die eineinhalbfache bis doppelte Menge Trenngemisch injiziert werden, damit der Peak für Detektor und Integrator auswertbar ist. Wie aber bereits beschrieben, hängt die Retentionszeit von der absoluten Menge an Base im Injektionsvolumen ab. Bei der Injektion größerer Mengen ergeben sich kürzere k'-Werte.

Tabelle 29: Retention als Funktion der Größe des Amins in der mobilen Phase

Amin	n-Butylamin		iso-Butylamin		tert.-Butylamin	
ppm	k'	a	k'	a	k'	a
2500	0.13	3.959	0.18	3.385	0.30	2.722
	0.51	1.792	0.62	1.791	0.81	1.699
	0.92		1.11		1.38	
1500	0.28	2.762	0.35	2.626	0.58	2.348
	0.78	1.687	0.91	1.738	1.35	1.625
	1.32		1.57		2.20	
1000	0.45	2.416	0.60	2.322	0.69	2.290
	1.08	1.636	1.39	1.663	1.58	1.612
	1.76		2.31		2.55	
500	0.93	2.017	1.17	2.066	1.65	1.931
	1.87	1.586	2.41	1.634	3.19	1.603
	2.97		3.94		5.11	
400	1.14	1.980	1.45	1.969	2.23	1.897
	2.25	1.580	2.86	1.554	4.23	1.596
	3.56		4.44		6.75	
250	2.02	1.913	2.11	1.844	3.20	1.935
	3.87	1.545	3.90	1.550	6.20	1.556
	5.97		6.04		9.65	
150	2.96	1.813	3.40	1.804	5.50	1.853
	5.42	1.546	6.14	1.528	10.20	1.572
	8.38		9.38		16.03	
100	4.23	1.818	4.85	1.785	8.39	1.867
	7.69	1.530	8.65	1.512	15.67	1.540
	11.76		13.08		24.14	
50	5.99	1.808	7.17	1.824	14.17	1.807
	10.84	1.523	13.08	1.528	25.61	1.594
	16.51		19.99		40.83	

Fortsetzung Tabelle 29:

Amin	N-Methylmorpholin		Piperidin		TEA	
ppm	k'	a	k'	a	k'	a
2500	0.39 0.97 1.60	2.473 1.651	0.21 0.64 1.11	2.971 1.736	0.21 0.56 0.98	2.710 1.741
1500	0.60 1.36 2.21	2.271 1.622	0.37 0.92 1.53	2.503 1.659	0.31 0.77 1.25	2.504 1.631
1000	0.85 1.82 2.84	2.136 1.587	0.55 1.26 2.04	2.280 1.622	0.51 1.11 1.81	2.166 1.621
500	1.67 3.30 5.18	1.977 1.571	1.12 2.24 3.53	2.001 1.576	0.87 1.69 2.69	1.948 1.591
400	1.92 3.73 5.80	1.940 1.557	1.24 2.45 3.89	1.970 1.586	1.08 2.02 3.15	1.879 1.559
250	3.11 5.89 9.21	1.894 1.562	1.81 3.43 5.35	1.898 1.561	1.67 2.90 4.53	1.738 1.562
150	4.31 7.99 12.34	1.854 1.543	2.94 5.24 8.24	1.786 1.572	3.00 5.00 7.82	1.667 1.565
100	6.62 12.19 18.87	1.840 1.548	3.98 6.85 10.84	1.720 1.584	4.29 6.79 10.07	1.583 1.484
50	9.34 17.59 26.56	1.883 1.510	5.83 10.38 16.28	1.779 1.569	9.45 14.63 20.52	1.547 1.403

In Tabelle 30 sind die Gleichungen der Form y = ax + b der Kurvenanpassung sowie die Korrelationskoeffizienten für die sechs getesteten Amine aufgelistet.

Tabelle 30: Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten der k'-Werte für verschiedene Amine in der mobilen Phase

stationäre Phase: Spherisorb ODS 2
Testgemisch: N-Deisopropyldisopyramid, Disopyramid, p-Chlorodisopyramid, je 10 µg

	Substanz		
Amin	N-Deisopropyl-disopyramid	Disopyramid	p-Chlorodisopyramid
n-Butyl-amin	0.06 + 430x (0.994)	0.38 + 750x (0.993)	0.71 + 1140x (0.993)
iso-Butyl-amin	0.12 + 480x (0.996)	0.55 + 830x (0.996)	1.05 + 1230x (0.995)
tert.-Butyl-amin	0.04 + 840x (0.999)	0.18 + 1530x (0.999)	0.45 + 2360x (0.999)
N-Methyl-morpholin	0.27 + 640x (0.995)	0.77 + 1140x (0.994)	1.28 + 1760x (0.993)
Piperidin	0.19 + 390x (0.993)	0.68 + 650x (0.988)	1.12 + 1010x (0.990)
TEA	-0.07 + 470x (0.998)	0.23 + 710x (0.998)	0.68 + 990x (0.998)

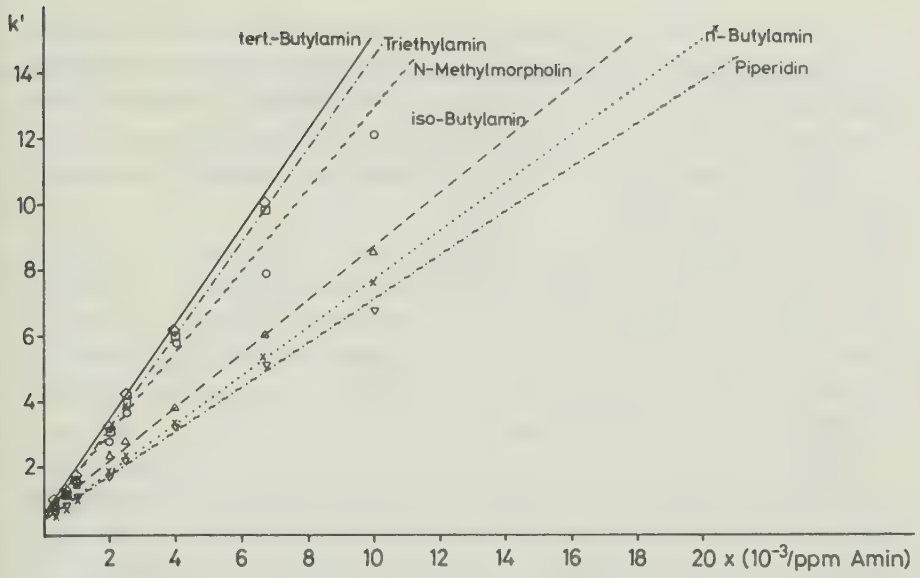


Abbildung 27: Retention von Disopyramid als Funktion des Amins in der mobilen Phase

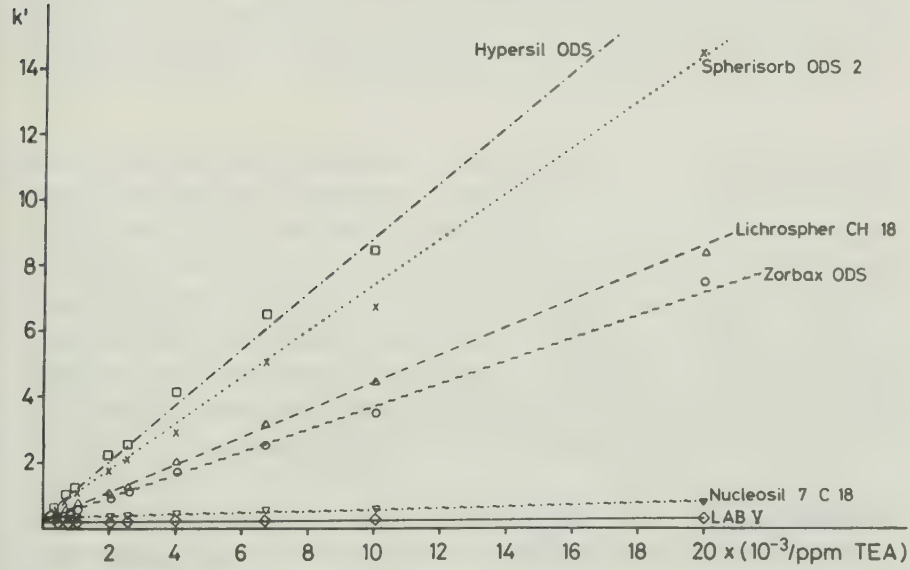


Abbildung 28: Retention von Disopyramid als Funktion der stationären Phase mit TEA in der mobilen Phase

Tabelle 30 und Abbildung 27 zeigen, daß sich für alle drei Testsubstanzen mit allen verwendeten Aminen Geraden ergeben, die bei Korrelationskoeffizienten von 0.988 und besser den Verlauf der Meßpunkte recht gut beschreiben. Für ein gegebenes Amin in der mobilen Phase hängt die Steigung der Geraden von der Größe und der Basizität der Testsubstanz ab: p-Chlorodisopyramid ergibt immer die größten Steigungen, N-Deisopropyldisopyramid die geringsten.

Im folgenden wird lediglich das Verhalten von Disopyramid diskutiert. Für die beiden anderen Testsubstanzen gelten jeweils die gleichen Schlußfolgerungen. In den Abbildungen werden ebenfalls nur die für Disopyramid ermittelten Werte gezeigt, da bei verschiedenen Aminen in der mobilen Phase oder mehreren stationären Phasen die Abbildungen sonst unübersichtlich würden.

Vergleicht man die k'-Werte von Disopyramid bei gleicher Aminkonzentration für verschiedene Amine in der mobilen Phase, so erkennt man deutliche Unterschiede. Die Reihe n-Butylamin, iso-Butylamin und tert.-Butylamin besteht aus primären Aminen, die sich in ihrer Basizität kaum unterscheiden (siehe Tabelle 27). Anhand dieser Reihe wurde der Einfluß der Größe des adsorbierten Amins auf die Retention untersucht. Alle drei Amine haben das gleiche Molekulargewicht und vergleichbare Dichten. In einem bestimmten Volumen befinden sich daher etwa gleiche molare Mengen, so daß man die k'-Werte untereinander vergleichen kann.

Bei einem Zusatz von tert.-Butylamin mit dem sehr sperrigen Alkylrest sind die k'-Werte etwa zwei- bis dreimal so hoch wie bei Verwendung von n-Butylamin. Das relativ kleine n-Butylamin hat die Möglichkeit, auch mit den Silanolgruppen in Wechselwirkungen zu treten, deren Zugang durch Alkylgruppen behindert ist. n-Butylamin erreicht also mehr Silanolgruppen als das größere tert.-Butylamin. Wenn n-Butylamin aber eine größere Anzahl von Silanolgruppen blockiert, stehen einer basischen Komponente des Testgemischs weniger Adsorptionsstellen zur Verfügung, die Verweildauer an der stationären Phase ist kürzer, die Retentionszeit wird kleiner. Die Retention basischer Moleküle kann direkt mit dem Flächenbedarf der Amine (Tabelle 28) korreliert werden.

Es fällt auf, daß bei hohen Aminkonzentrationen in der mobilen Phase die Nettoretention sehr gering ist. Wenn alle Silanolgruppen durch ein Amin aus der mobilen Phase blockiert sind, können die Testsubstanzen nur über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Alkylketten der stationären Phase retardiert werden. Bei der gegebenen Zusammen-

setzung der mobilen Phase werden die Testsubstanzen aber nur sehr wenig über hydrophobe Kräfte retardiert. Der für Basen wesentlichere Retentionsmechanismus beruht auf Wechselwirkungen mit freien Silanolgruppen. Man kann diskutieren, welcher Art diese Wechselwirkung ist. Eine ionische Wechselwirkung unter Bildung eines Ionenpaares aus SiO^- und NR_4^+-Gruppen ist genauso denkbar wie Wasserstoffbrückenbindungen. Trotz eines - formal gesehen - reversed-phase-Systems, beruht der Trenneffekt auf einer Adsorption an Silanolgruppen, ähnlich der Trennung unter normal-phase-Bedingungen mit polaren stationären und unpolaren mobilen Phasen.

Wie die Trennungen mit isomeren Butylaminen zeigen, ist die Größe des Amins der mobilen Phase und damit die Zugänglichkeit einer Silanolgruppe der Hauptgrund für ihre Abschirmung. Um bei konstanter Größe des Amins die Einflüsse des pKb-Wertes zu untersuchen, wurden neben TEA noch zwei weitere Amine, Piperidin und N-Methylmorpholin, in die Versuchsreihe mit aufgenommen. Piperidin mit einem pKb-Wert von 2.99 ist eine geringfügig stärkere Base als TEA, N-Methylmorpholin (pK_b-Wert 6.59) eine wesentlich schwächere Base. Die Ergebnisse der Meßreihen sind in den Tabellen 29 und 30 sowie in Abbildung 27 dargestellt und lassen vermuten, daß tatsächlich die Größe des Moleküls der dominierende Faktor bei der Abschirmung von Silanolgruppen ist. Die Stärke der Basizität ist von untergeordneter Bedeutung. Allerdings muß der pK_b-Wert groß genug sein, um eine Wechselwirkung mit den SiOH-Gruppen zu ermöglichen.

4.2.2.6. Einfluß der stationären Phase

Da bei der Herstellung von kommerziellen RP-Phasen sowohl Ligandendichte wie -funktionalität als auch die Eigenschaften des Basissilicagels variieren, wurde mit einer Reihe von fünf, in Westeuropa häufig verwendeten, sphärischen RP-Packungsmaterialien der Einfluß der stationären Phase auf die Adsorption von Basen untersucht. Neben Spherisorb ODS 2 und Hypersil ODS wurden Lichrospher CH-18, Zorbax ODS und Nucleosil C 18 sowie die auf Nucleosil-Basis modifizierte Phase LAB V verwendet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 30 und 31 aufgelistet und in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

Die größte Steigung und damit die meisten, für TEA zugänglichen, Silanolgruppen findet man beim Hypersil-Material. Drei weitere stationäre Phasen, Spherisorb ODS 2, Zorbax ODS und Lichrospher CH-18, zeigen ein gleiches Verhalten. Lediglich die Steigung der Gerade und somit die Anzahl zugänglicher Silanolgruppen ist leicht unterschiedlich. Allen vier stationären Phasen dieser Gruppe ist eine irreversible Adsorption des basischen Trenngemischs gemeinsam, falls in der mobilen Phase kein Amin enthalten ist. Die Abhängigkeit der Retention von der Aminkonzentration in der mobilen Phase läßt sich mit der oben abgeleiteten Theorie sehr gut beschreiben.

Ein gänzlich anderes Verhalten zeigen die beiden restlichen stationären Phasen, Nucleosil C 18 und LAB V. Beide Phasen haben das gleiche Basissilicagel. Nucleosil C 18 wird mit einem trifunktionellen Octadecylsilan und nachfolgendem "endcapping" mit einem Trimethylsilan hergestellt, LAB V mit monofunktionellem Octadecyldimethylmethoxysilan modifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Herstellungsweise der beiden RP-Materialien ist sichergestellt, daß nicht die Modifizierung, sondern das Ausgangssilicagel die Ursache für ihr Verhalten gegenüber basischen Substanzen ist.

Beide stationären Phasen zeigen nur eine geringe Abhängigkeit des k'-Wertes von der Aminkonzentration der mobilen Phase. Auch ohne Amin können die Testsubstanzen eluiert werden, die Selektivität unterscheidet sich nicht sehr von der bei einer Aminkonzentration von 2500 ppm. Die teilweise recht großen Selektivitäten in Tabelle 30 sind ausschließlich auf die sehr niedrigen Retentionen zurückzuführen.

Bei einer Auftragung der k'-Werte als Funktion der Aminkonzentration in der mobilen Phase ergeben sich keine hyperbolischen Kurven. Die k'-Werte als Funktion der reziproken Aminkonzentration ergeben zwar Geraden, jedoch sind die Steigungen dieser Geraden eine Größenordung niedriger als die der "Hypersil-Gruppe". Zudem sind die Korrelationskoeffizienten mit Werten um 0.94 für Nucleosil C 18 sehr schlecht. Bei LAB V sind die Retentionsdaten nahezu unabhängig von der Aminkonzentration der mobilen Phase, die Korrelationskoeffizienten der Kurvenanpassungen sind nahe 0, d.h. aus den gegebenen Werten kann man keine Geradengleichung aufstellen. Das Verhalten dieser stationären Phasen ist nicht mit der Theorie der Adsorption von Basen an RP-Phasen darstellbar.

Tabelle 31: Retention als Funktion der stationären Phase

st. Phase	Hypersil ODS		Spherisorb ODS		Lichrospher CH 18	
ppm	k'	a	k'	a	k'	a
	0.23	2.469	0.21	2.710	0.08	3.920
2500	0.57	1.671	0.56	1.741	0.30	1.971
	0.96		0.98		0.60	
	0.41	2.088	0.31	2.504	0.13	3.280
1500	0.86	1.630	0.77	1.631	0.43	1.806
	1.41		1.25		0.78	
	0.68	1.883	0.51	2.166	0.17	3.016
1000	1.28	1.599	1.11	1.621	0.52	1.773
	2.05		1.81		0.93	
	1.34	1.724	0.87	1.948	0.49	2.024
500	2.31	1.552	1.69	1.591	0.99	1.603
	3.59		2.69		1.59	
	-	-	1.08	1.879	0.60	1.882
400	-	-	2.02	1.559	1.13	1.566
	-		3.15		1.77	
	2.50	1.649	1.67	1.738	1.15	1.741
250	4.12	1.538	2.90	1.562	2.00	1.536
	6.34		4.53		3.07	
	4.17	1.569	3.00	1.667	1.97	1.581
150	6.54	1.524	5.00	1.665	3.12	1.469
	9.96		7.82		4.58	
	5.43	1.547	4.29	1.583	2.75	1.548
100	8.40	1.522	6.79	1.484	4.26	1.483
	12.78		10.07		6.32	
	8.86	1.551	9.45	1.547	5.52	1.535
50	13.73	1.510	14.63	1.403	8.47	1.448
	20.74		20.52		12.27	

Fortsetzung Tabelle 31:

st. Phase	Zorbax ODS		Nucleosil C 18		LAB V	
ppm	k'	a	k'	a	k'	a
2500	0.09	4.158	0.01	-	0.05	5.167
	0.35	1.907	0.21	2.118	0.24	1.806
	0.68		0.44		0.43	
1500	0.18	2.838	0.01	-	0.05	5.306
	0.50	1.708	0.21	2.118	0.25	1.838
	0.85		0.44		0.45	
1000	0.25	2.587	0.06	4.804	0.03	8.143
	0.65	1.694	0.29	1.928	0.22	1.877
	1.10		0.55		0.41	
500	0.42	2.117	0.10	3.171	0.05	4.333
	0.89	1.645	0.31	1.975	0.20	1.962
	1.47		0.61		0.39	
400	0.55	2.035	0.12	3.033	0.05	5.722
	1.12	1.582	0.36	1.779	0.26	1.801
	1.77		0.63		0.48	
250	1.00	1.870	0.18	2.312	0.04	5.194
	1.87	1.577	0.42	1.767	0.21	2.118
	2.94		0.74		0.44	
150	1.43	1.763	0.29	1.951	0.05	4.659
	2.53	1.572	0.57	1.669	0.25	1.864
	3.97		0.95		0.46	
100	2.05	1.706	0.31	1.913	0.05	4.611
	3.49	1.557	0.60	1.651	0.21	1.934
	5.44		0.98		0.41	
50	4.58	1.646	0.52	1.623	0.05	5.028
	7.53	1.477	0.84	1.614	0.23	1.829
	11.13		1.36		0.42	
0	+∞	-	0.65	1.499	0.05	5.722
	+∞	-	0.97	1.632	0.26	1.801
	+∞		1.58		0.48	

Tabelle 32: Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten der k'-Werte für verschiedene stationäre Phasen

Amin in der mobilen Phase: TEA
Testgemisch: N-Deisopropyldisopyramid, Disopyramid, p-Chlorodisopyramid, je 10 µg

	Substanz		
	N-Deisopropyl-disopyramid	Disopyramid	p-Chlorodisopyramid
Hypersil ODS	0.15 + 550x (0.991)	0.49 + 830x (0.989)	0.85 + 1260x (0.989)
Spherisorb ODS 2	-0.08 + 470x (0.998)	0.23 + 710x (0.998)	0.67 + 990x (0.998)
Lichrospher CH-18	-0.04 + 280x (0.999)	0.17 + 420x (0.999)	0.42 + 590x (0.999)
Zorbax ODS	-0.01 + 220x (0.996)	0.22 + 360x (0.996)	0.50 + 530x (0.997)
Nucleosil C 18	0.04 + 25x (0.943)	0.26 + 31x (0.932)	0.50 + 46x (0.942)

Die Versuchsergebnisse legen den Schluß nahe, daß die Materialien vom "Nucleosil-Typ" keine oder nur geringe Mengen an chromatographisch zugänglichen Silanolgruppen besitzen. Der Trennmechanismus für basische Substanzen beruht daher (fast) ausschließlich auf hydrophoben Wechselwirkungen mit Alkylketten. Bei der Zusammensetzung der mobilen Phase ist die Wechselwirkung der Probenmoleküle mit der unpolaren Phase allerdings sehr schwach, weshalb die k'-Werte so klein sind. Silanophile Wechselwirkungen sind durch den Herstellungsprozeß der stationären Phase und ursächlich durch die Eigenschaften und die Oberflächenstruktur des Ausgangssilicagels ausgeschaltet.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit (137) wird ebenfalls die Konzentration an freien Silanolgruppen verantwortlich gemacht für die Adsorption von N,N-Dimethylanilin, dem basischen Bestandteil des untersuchten Testgemischs. Die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigen die beschriebene Einteilung der Silicagele in zwei Klassen. Allerdings besitzt nach den hier vorliegenden Untersuchungen ein Silicagel vom "Zorbax-Typ" nicht eine geringere, sondern eine höhere Konzentration an Silanolgruppen als Materialien vom "Nucleosil-Typ". Auch die Auffassung, nach der es auf der Oberfläche von Silicagelen verschieden reaktive Silanolgruppen geben soll, wobei nur die freien Silanolgruppen für die Adsorption von Basen verantwortlich gemacht werden, kann nicht geteilt werden.Eine der Voraussetzungen der theoretischen Ableitung ist ja die Gleichheit aller Adsorptionszentren.

Die Trennung basischer Substanzen auf Materialien vom Nucleosil-Typ leidet oft an schlechten Selektivitäten. Bisher gab es allerdings keine Alternative zu diesen Materialien. Der Einsatz von Aminen in der mobilen Phase ermöglicht auf allen RP-Phasen die Trennung von Basen und erlaubt durch die Wahl der Aminkonzentration eine Verschiebung der Retentionszeiten in großem Umfang. Die hier vorgestellten Versuchsergebnisse wurden zwar in der beschriebenen Systematik nur an diesem einen Trennbeispiel aus der klinischen Chemie durchgeführt, doch, wie die Trennungen anderer basischer Substanzen zeigen, gelten die Schlußfolgerungen allgemein. Man kann Amine in der mobilen Phase als weitere Möglichkeit zur Beeinflussung des Trennverhaltens von Basen verstehen, wobei die Wahl der Aminkonzentration das Retentionsverhalten von Basen und damit ihre Auftrennung erlaubt.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Die Ergebnisse der chromatographischen und NMR-spektroskopischen Messungen wurden bereits im allgemeinen Teil (Kapitel 2 bis 4) beschrieben und diskutiert. Daher wird an dieser Stelle auf eine nochmalige Beschreibung dieser Versuchsergebnisse verzichtet, lediglich die allgemeinen Geräteparameter der NMR- und der HPLC-Geräte werden beschrieben.

5.1. DARSTELLUNG DER MODIFIZIERTEN SILICAGELPHASEN

Die RP-Phasen (LAB I bis LAB VII) wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen von Frau B. Peters nach folgender Arbeitsvorschrift dargestellt: 5 g Nucleosil 100 7 µ (Macherey und Nagel, Düren), entsprechend 3.5 mmol SiOH/g, wurden bei 150 bis 200 °C 24 Stunden im Vakuum getrocknet und anschließend in 250 ml 1,2,4-Trichlorbenzol suspendiert. Zu dieser Suspension wurde unter Stickstoffatmosphäre Octadecyldimethylmethoxysilan (Fa. Wacker, Burghausen) hinzugefügt. Die Menge an Octadecyldimethylmethoxysilan variierte je nach angestrebter Beladung der Phase zwischen 10 und 25 mmol. Die Suspension aus Silicagel und Silan wurde 24 Stunden unter Rückflußbedingungen erhitzt, das Reaktionsprodukt abfiltriert, mehrmals mit Trichlorbenzol und Methanol gewaschen und 30 Stunden im Vakuum getrocknet.

Die Nachbehandlung ("endcapping") der Phasen LAB II und LAB III erfolgte analog zu obiger Arbeitsvorschrift. Anstelle des Basissilicagels wurde LAB II oder LAB III in 1,2,4-Trichlorbenzol suspendiert und statt des Octadecyldimethylmethoxysilans 8 mmol Trimethylchlorsilan und 8.7 mmol Hexamethyldisilazan hinzugefügt. Die weitere Aufarbeitung entsprach der oben beschriebenen.

Die Elementaranalysen der stationären Phasen wurden mit einem Gerät der Firma Carlo Erba, Modell 1104, durchgeführt. In Tabelle 32 sind die Kohlenstoffgehalte der aus Nucleosil dargestellten ODS-Phasen sowie einige daraus berechnete Phasendaten auf-

gelistet. Neben der absoluten Mengen an Octadecyl- und Trimethylsilan wurde auch der organische Anteil der stationären Phase in g/g sowie die Konzentration an Silanolgruppen berechnet.

Tabelle 32: Phasendaten von ODS-Phasen

Phase	% C	mmol ODS	mmol TMS	Σ (ODS + TMS)	B_g (g/g)	µmol SiOH/g
Nucleosil	-	-	-	-	-	3.267
LAB I	12.53	0.522	-	0.522	0.163	2.736
LAB II	8.32	0.346	-	0.346	0.108	2.915
LAB IIe	10.83	0.346	0.697	1.143	0.159	2.750
LAB III	13.77	0.573	-	0.573	0.179	2.684
LAB IIIe	15.03	0.573	0.350	0.923	0.204	2.599
LAB IVa	0.97	-	0.269	0.269	0.020	3.205
LAB IV	9.50	0.353	0.269	0.622	0.130	2.847
LAB V	16.16	0.673	-	0.673	0.210	2.582
LAB VI	16.46	0.685	-	0.685	0.214	2.570
LAB VII	7.38	0.307	-	0.307	0.096	2.955

5.2. NMR-UNTERSUCHUNGEN

5.2.1 CP-MAS-NMR-Spektren

Die ^{29}Si- und ^{13}C-CP-MAS-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker CXP-300 Fourier Transform NMR-Spektrometer mit 100 bis 200 mg Probensubstanz in Bornitrid Rotoren mit 6.3 mm Innendurchmesser aufgenommen. CP-MAS wurde mit alternierender Inversion der 90° Pulsphase verwendet. Die Proton 90° Pulslänge betrug 4.5µsec, die Kontaktzeit 5 (^{29}Si) bzw. 3 (^{13}C) msec und die Repetitionszeiten 4 bis 6 sec. Die

Rotationsgeschwindigkeit lag zwischen 3.5 und 5.0 kHz, so daß für diese Verbindungen mit einem geringen chemischen Anisotropieverschiebungstensor keine Seitenbanden auftraten. Die Einstellung des magischen Winkels wurde zwischen den Experimenten mit Glycin kontrolliert; die Linienbreite des Carbonylsignals überschritt in keinem Fall 30 Hz. Die chemischen Verschiebungen wurden auf Tetramethylsilan bezogen, das Carbonylsignal des Glycins bei 179.09 ppm als sekundärer Standard verwendet.

5.2.2. Suspensions-NMR-Spektren

Die ^{13}C-NMR-Suspensionsmessungen wurden in 10 mm Probenröhrchen an einem Bruker WH 90 sowie einem Bruker MSL 200 Fourier Transform NMR-Spektrometer unter Anwendung der Protonenbreitbandentkopplung bei 303 K durchgeführt. Für die Messungen am Bruker WH 90 wurden 600 bis 700 mg stationäre Phase in 2.4 ml Suspensionsmedium aufgeschlämmt und durch einen PTFE-Plug mit einem Innendurchmesser von 6 mm auf eine Höhe von 10 mm justiert. Messungen am Bruker MSL 200 wurden mit der doppelten Menge sowohl an stationärer Phase wie auch Suspensionsvolumen durchgeführt.

Für die Relaxationsmessungen wurde am WH 90 ein 90° Puls von 16 µsec (8 µsec am MSL 200) bei einer Meßzeit von 0.68 sec (6000 Hz/8K) und einer Wartezeit von 1 sec benützt. Typische Spektren wurden aus der Addition von 5000 bis 10000 Scans erhalten.

5.3. Chromatographische Untersuchungen

Die Mehrzahl der chromatographischen Experimente wurde mit einer HPLC-Anlage HP LC 1084 mit variablem Wellenlängendetektor der Firma Hewlett-Packard, Waldbronn, durchgeführt. Für einzelne Meßreihen wurden Gerätekomponenten verschiedener Firmen speziell zusammengestellt. Als Fließmittelfördersysteme kamen Pumpen der Firma Waters, Eschborn (Waters M 6000 A), und Perkin Elmer, Überlingen, (LC Pumpe Serie 10), als Einspritzsysteme der Einspritzblock RH 7120 der Firma Rheodyne, Frankfurt, als Detektoren der Diodenarraydetektor der Firma Hewlett-Packard (HP 1040), ein

RI-Detektor 98.00 der Firma Knauer, Bad Homburg, sowie ein UV-Detektor der Firma Bruker, Rheinstetten, zum Einsatz.

Die verwendeten Stahlsäulen des Typs Hyperchrome der Firma K. Bischoff, Leonberg, hatten die Dimension 250 oder 125 * 4.6 mm Innendurchmesser und wurden mit einem Säulenpackgerät der Firma Shandon, Frankfurt, gefüllt. Zum Füllen der Säulen wurde die stationäre RP-Phase in Isopropanol suspendiert und nach fünfminütiger Ultraschallbehandlung mit einem Druck von 500 bis 600 bar und Methanol als Druckflüssigkeit in die Säule eingefüllt. Die Säulen wurden mit den kommerziell erhältlichen HPLC-Materialien Lichrospher CH 18, Lichrosorb RP18, Hypersil ODS, Partisil ODS 3, Spherisorb ODS 2, Nucleosil C 18 (alle Firma K. Bischoff, Leonberg) sowie als Hypersil (Fa. Shandon, Frankfurt) und Nucleosil (Macherey & Nagel, Düren) als Silicagelphasen gefüllt. Die im Hause hergestellten ODS-Phasen wurden nach der gleichen Füllvorschrift gepackt.

Das für chromatographische Analysen verwendete Acetonitril wurde in HPLC-Qualität von verschiedenen Herstellern bezogen, das verwendete Wasser mit einer Mischbettentsalzungsanlage der Firma Millipore, Neu-Isenburg, im Hause gereinigt. Die Alkylbenzole und die Amine wurden in höchstmöglicher Reinheit von der Firma Fluka, Neu-Ulm bezogen, deuterierte Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie kamen von der Firma Merck, Darmstadt.

Disopyramid, N-Deisopropyldisopyramid und p-Chlordisopyramid waren ein Geschenk der Fa. Roussel-Uclaf, Wiesbaden, an Prof. Dr. T. Risler, Medizinische Klinik Tübingen, der mir die Substanzen für die Entwicklung eines Trennsystems zur Verfügung stellte.

Alle chromatographischen Analysen wurden bei einem Sollfluß von 1 ml/min durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben war die Temperatur die jeweilige Raumtemperatur (25 ± 1 °C). An Probenmenge wurde jeweils in 10 µl etwa einige µg/Substanz injiziert. Jede Analyse wurde wenigstens zweimal wiederholt und der Mittelwert dreier Bruttoretentioszeiten zur Berechnung von k'-Werten und a-Werten verwendet. Die Berechnungen von Retentions- und Selektivatätsdaten sowie die Kurvenanpassungen wurden auf einem HP 85 Personal Computer durchgeführt.

6. DANK

Eine Arbeit wie die vorliegende kann nicht in einem stillen Labor von einer Person allein erdacht und durchgeführt werden, sondern sie ist das Produkt der Zusammenarbeit und der Diskussion mit vielen. Allen, die in den letzten drei Jahren mit mir zusammen Ideen für diese Arbeit mitentwickelt und in die Praxis umgesetzt haben, möchte ich hiermit recht herzlich danken. Die nachfolgende Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, und die Reihenfolge stellt keine Bewertung dar.

Mit Dr. Klaus Albert und Bernadette Peters zusammen wurde die Idee geboren, RP-Phasen sowohl mit HPLC- als auch mit NMR-Methoden zu untersuchen, was sich für alle als fruchtbar erwies. Dr. Klaus Albert danke ich speziell für die vielen Stunden vor dem NMR-Spektrometer, in denen er mit der Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren beschäftigt war, Frau Peters für die Herstellung der stationären Phasen sowie die vielen Anregungen in lebhaften Diskussionen.

Mit Edgar Grom, der die Säulen für mich packte, verbinde ich die Erinnerung an vier gemeinsam verbrachte, schöne Jahre in einem Labor. Den restlichen Mitarbeitern des AK Bayer, von denen ich Dr. Hans-Peter Seelmann-Eggebert, Dr. Ernst Küsters, Dr. Jürgen Reinhard, Dr. Jürgen Gerhard, Graeme Nicolson sowie die Mitglieder des Peptid-Labors Dr. Wolfgang Rapp, Heribert Hellstern, Rainer Häbich und last but not least Werner Bretzel besonders nennen möchte, danke ich für Hinweise, Diskussionen und Feste.

Die Fachgespräche, die ich mit den Mitgliedern der Arbeitskreise Prof. Unger, Mainz, Prof. Halasz und Prof. Engelhardt, Saarbrücken, sowie den Mitarbeitern von Hewlett-Packard, Waldbronn, besonders Dr. Manfred Riedmann, geführt habe, gaben mir immer wieder neue Anregungen für meine Arbeit. Am Institut von Prof. Unger wurden die Oberflächenbestimmungen der stationären Phasen sowie die Bestimmung der Silanolgruppenkonzentration durchgeführt. Auch dafür recht herzlichen Dank.

Mit Frau K. Ress, Medizinische Klinik Tübingen, konnte ich interessante Diskussionen über die Analytik von Pharmaka führen, die mir immer wieder neue Anregungen für diese Arbeit brachten. Bei der Werkstatt des chemischen Zentralinstituts der Universität

Tübingen und vor allem bei Herrn H. Kannwischer möchte ich mich für die prompte und fachkundige Hilfe und Beratung bei der Reparatur der HPLC-Anlagen bedanken.

Der Hanns-Seidel-Stiftung in München danke ich für die Gewährung eines Graduiertenstipendiums, mit dessen Hilfe ich mich in den letzten beiden Jahren ganz auf die Fertigstellung dieser Arbeit konzentrieren konnte.

Daß diese Arbeit termingerecht fertiggestellt wurde, ist auch ein Verdienst von Frau D. Vieillard-Baron, die unermüdlich eine Vielzahl von Zeichnungen angefertigt hat, sowie Dr. Brigitte Hofmann, die mir zum Schreiben dieser Arbeit einen Apple-IIe-Computer samt Textverarbeitungsprogramm geliehen hat. Schließlich haben Brigitte, Werner, Manuel und Dagmar mit großem Engagement meine Manuskrite Korrektur gelesen.

Zum Schluß soll das Verdienst meiner Eltern, meiner beiden Brüder und meiner gesamten Familie nicht unerwähnt bleiben, die mich immer wieder in meinen Plänen und Arbeiten bestärkt haben.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Charakterisierung stationärer Phasen und ihr Einfluß auf das Verhalten des chromatographischen Trennsystems beschrieben. Neben kommerziellen ODS-Phasen wurden auch mit monofunktionellem Silan modifizierte Silicagele in die Untersuchung mit einbezogen. Neben der Bestimmung des Kohlenstoffgehalts und der BET-Oberfläche und den sich hieraus ableitenden Phasendaten stand die Charakterisierung mit chromatographischen und NMR-spektroskopischen Methoden im Mittelpunkt.

Durch Festkörper-NMR-Spektroskopie kann man die Funktionalität des zur Modifizierung verwendeten Silans bestimmen und eine eventuelle Nachbehandlung mit einem Trimethylsilan nachweisen. Kommerzielle Phasen, die sich durch die Eigenschaften des Basissilicagels und die Reaktionsbedingungen bei der Modifizierung in weiten Grenzen unterscheiden, sind damit besser zu charakterisieren. Allerdings ist eine eindeutige Korrelation zwischen Eigenschaften der stationären Phase und chromatographischem Verhalten nicht zu finden.

In einem chromatographischen Experiment kommt es zu Wechselwirkungen der stationären Phase mit den Probensubstanzen und der mobilen Phase. Bei der Bestimmung von Eigenschaften der stationären Phase im "trockenen" Zustand, also ohne Kontakt zur mobilen Phase, ist die Gefahr gegeben, daß die so bestimmten Eigenschaften keine chromatographische Relevanz aufweisen. Deshalb wurde die stationäre Phase in der mobilen Phase suspendiert und damit Bedingungen für eine spektroskopische Untersuchung geschaffen, die denen in einer chromatographischen Trennsäule entsprechen.

In Suspension wurde mit Hilfe von ^{13}C-Spin-Gitter-Relaxationsmessungen die Beweglichkeit der auf der Oberfläche des Silicagels gebundenen Alkylkette als Funktion der Beladung und der Polarität der mobilen Phase bestimmt. Die Beweglichkeit der Alkylkette nimmt dabei mit zunehmender Beladung und abnehmender Polarität der mobilen Phase ab. Eine Nachbehandlung der RP-Phase mit einem Trimethylsilan ("endcapping") verursacht ebenfalls eine deutliche Abnahme der Beweglichkeit der Alkylketten.

Die spektroskopisch bestimmte Beweglichkeit der Alkylketten korreliert mit den chromatographischen Ergebnissen. Die Retention von Alkylbenzolen, die lediglich zu hydrophoben Wechselwirkungen mit der stationären Phase fähig sind, steigt ebenfalls mit der Beladung der RP-Phase, der Polarität der mobilen Phase oder durch "endcapping" an. Die Beweglichkeit der Alkylkette ist somit ein Indikator für das chromatographische Verhalten.

Mit Hilfe der gleichen Untersuchungsmethode, der Relaxationsmessung an suspendierten stationären Phasen, sind neben hydrophoben auch silanolphile Wechselwirkungen nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, daß basische Amine mit den Silanolgruppen der stationären Phase in Wechselwirkung treten. Die Adsorption von TEA wurde in Abhängigkeit der Beladung der ODS-Phase, der Menge an TEA im Suspensionsmedium und als Funktion des Basissilicagels untersucht. Nucleosil und Hypersil, die beide als Basismaterial für ODS-Phasen Verwendung finden, zeigen deutliche Unterschiede in ihrem Adsorptionsverhalten gegenüber TEA.

Silanophile Wechselwirkungen stören in vielen Fällen die Chromatographie basischer Substanzen. Mit einer basischen Substanz in der mobilen Phase in einer Konzentration von 50 bis 2500 ppm können solche unerwünschten Wechselwirkungen unterdrückt werden. Zur theoretischen Beschreibung der Adsorption von Basen an ODS-Phasen wurde die Theorie von Langmuir zur Beschreibung der Adsorption von Gasen an Festkörperoberflächen entsprechend modifiziert. Mit Hilfe dieser Theorie ist das Verhalten basischer Moleküle mit polaren Zentren der stationären Phase einfach zu verstehen.

Der Ableitung zufolge ist der k'-Wert eine Funktion der Menge Base im Trenngemisch sowie der Konzentration und der Eigenschaften (Größe und Basizität) der Base in der mobilen Phase. Diese Vorhersagen konnten für zwei Konzentrationen an Base im Trenngemisch, für vier stationäre Phasen und sechs verschiedene Amine in der mobilen Phase bestätigt werden.

Durch die Zugabe eines Amins in die mobile Phase kommt es zu einer Konkurrenz der basischen Moleküle des Trenngemischs und der mobilen Phase um die Adsorptionsplätze an der stationären Phase, die Silanolgruppen.

Es stellte sich heraus, daß zur Unterdrückung der silanophilen Wechselwirkung das Amin mit der geringsten sterischen Hinderung, n-Butylamin, am wirksamsten ist. Die stationären Phasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe, zu der Hypersil ODS, Spherisorb ODS, Zorbax ODS und Lichrospher C 18 gehören, zeigen eine Abhängigkeit der Retention von der Konzentration an Amin in der mobilen Phase. Bei aus dem Basismaterial Nucleosil hergestellten ODS-Phasen sind bei der Zugabe von Amin in die mobile Phase kaum Unterschiede im Retentionsverhalten basischer Substanzen festzustellen. Dies bedeutet, daß mit stationären Phasen aus der ersten Gruppe silanophile Wechselwirkungen möglich sind, während bei stationären Phasen aus der zweiten Gruppe dies nicht oder nur in einem geringen Maß der Fall ist.

Durch die Zugabe eines Amins in die mobile Phase ist die Trennung basischer Substanzen, wie sie in der Biochemie, der Pharmazie und der klinischen Chemie häufig anzutreffen sind, mit der RP-Chromatographie möglich. Die Retention von Basen ist über die Wahl der Konzentration an Amin in der mobilen Phase in weiten Grenzen beeinflußbar. Damit ist ein weiterer Parameter zur Optimierung chromatographischer Trennungen eindeutig definiert.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1) M.S. Tswett, Ber. Dtsch. Bot. Ges. 24 (1906) 316.
2) M.S. Tswett, Ber. Dtsch. Bot. Ges. 24 (1906) 384.
3) L.S. Ettre und Cs. Horvath, Anal. Chem. 47 (1975) 422 A.
4) L.S. Ettre in: Cs. Horvath (ed.), High Performance Liquid Chromatography - Advances and Perspectives, Vol. 1, Academic Press, New York 1980, S. 1ff.
5) L.S. Ettre, Open Tubular Columns in Gas-Chromatography, Plemum Press, New York 1965.
6) L.R. Grob, Modern Practise of Gas Chromatography, John Wiley & Sons, London 1977.
7) G. Schomburg, Gaschromatographie, in: Studienbücher der instrumentellen Analytik, Verlag Chemie, Weinheim 1977.
8) A. Wollrab, Gaschromatographie, in: Laborbücher Chemie, Diesterweg Salle Sauerländer, Frankfurt 1983.
9) L.R. Snyder und J.J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, 2nd. ed. New York 1980.
10) H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer-Verlag, 2. Aufl., Berlin 1979.
11) Cs. Horvath (ed.), High Performance Liquid Chromatography - Advances and Perspectives, Vol. 1 und 2, Academic Press, New York 1980.
12) V. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Diesterweg Salle Sauerländer 2. Aufl., Frankfurt 1984.
13) C.F. Simpsom (ed.) Techniques in Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, New York 1982.
14) I. Halasz und G.Görlitz, Angew. Chem. 94 (1982) 50.
15) G.A. Howard und A.J.P. Martin, Biochem. J., 46 (1950) 215.
16) F. Helffrich, Ionenaustauscher, Verlag Chemie, Weinheim 1959.
17) L. R. Snyder, Principles of Adsorption Chromatography, Marcel Dekker, New York 1968.
18) Cs. Horvath, W. Melander und I. Molnar, J. Chromatogr. 125 (1976) 129.
19) B.L. Karger, J.R. Gant, A. Hartkopf und P.H. Weiner, J. Chromatogr. 128 (1976) 65.

20) W.R. Melander und Cs. Horvath in: Cs. Horvath (ed.) High Performance Liquid Chromatography - Advances and Perspectives, Vol. 2, Academic Press, New York 1980, S. 114ff.
21) W.R. Melander, J. Stoveken und Cs. Horvath, J. Chromatogr. 199 (1980) 35.
22) W.R.Melander, C.A. Mannan und Cs. Horvath, Chromatographia 15 (1982) 611.
23) W.R. Melander und Cs. Horvath, Chromatographia 18 (1984) 353.
24) D.C. Locke, J. Chromatogr. Sci. 12 (1974) 433.
25) T. Hanai und J. Hubert, J. Chromatogr. 290 (1984) 197.
26) K. Jinno und K. Kawasaki, J. Chromatogr. 316 (1984) 1.
27) R. Kaliszan, K. Osmialowski, S.A. Tomellini, S.Hsu und R.A. Hartwick, Chromatographia 20 (1985) 705.
28) Jinno und K. Kawasaki, Chromatographia 17 (1983) 337.
29) K. Jinno und K. Kawasaki, Chromatographia 18 (1984) 90.
30) K. Jinno und M. Okamoto, Chromatographia 18 (1984) 495.
31) W.R. Melander und Cs. Horvath, Chromatographia 15 (1982) 86.
32) P.C. Sadek, P.W. Carr. R.M. Doherty, M.J. Kamlet, R.W. Taft und M.H. Abraham, Anal. Chem. 57 (1985) 2971.
33) A. Bondi, J. Phys. Chem. 68 (1964) 441.
34) L.B. Klier und L.H. Hall, Molekular Connectivity in Chemistry and Drug Research, Academic Press, New York 1976.
35) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam 1977.
36) C. Hansch und A. Leo, Substituted Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley & Sons, New York 1979.
37) A. Nahum und Cs. Horvath, J. Chromatogr. 203 (1981) 53.
38) K.E. Bij, Cs. Horvath, W.R. Melander und A. Nahum, J. Chromatogr. 203 (1981) 65.
39) R.N. Nikolov, J. Chromatogr. 286 (1984) 147.
40) K. Albert, B. Ewers und E. Bayer, J. Magn. Reson. 62 (1985) 428.
41) E. Bayer, A. Paulus, B. Peters, G. Laupp, J. Reiners und K. Albert, J. Chromatogr. (1986) im Druck.
42) M.E. McNally und L.B. Rogers, J. Chromatogr. 331 (1985) 23.
43) R.K. Gilpin, Anal. Chem. 57 (1985) 1465 A.
44) R.K. Gilpin und M.E. Gangoda, J. Chromatogr. Sci. 21 (1983) 352.
45) R.K. Gilpin und M.E. Gangoda, Anal. Chem. 56 (1984) 1470.

46) G.E. Maciel und D.W. Sindorf, J. Am Chem Soc. 102 (1980) 7606.
47) G.E. Maciel, D.W. Sindorf und V.J. Bartuska, J. Chromatogr. 205 (1981) 438.
48) D.W. Sindorf und G.E. Maciel, J. Phys. Chem. 86 (1982) 5208.
49) D.W. Sindorf und G.E. Maciel, J.Am.Chem.Soc. 105 (1983) 1487.
50) M.L. Miller, R.W. Linton, G.E. Maciel und B.L. Hawkins, J. Chromatogr. 319 (1985) 9.
51) H.A. Claessens, L.J.M. van de Ven, J.W. de Haan, C.A. Cramers und N. Vonk, HRC CC 6 (1983) 433.
52) E. Bayer, K. Albert, J. Reiners und M. Nieder, J. Chromatogr. 264 (1983) 197.
53) H.A. Claessens, C.A. Cramers, J.W. de Haan, F.A.H. den Otter, L.J.M. van de Ven, P.J. Andree, G.J. de Jong, N. Lammers, J. Wijma und J. Zeeman, Chromatographia 20 (1985) 582.
54) J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg und A. Klinkenberg, Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 271.
55) J.C. Giddings, Dynamics of Chromatography Part 1, Marcel Dekker, New York (1965).
56) G. Guichon in: Cs. Horvath (ed.), High Performance Liquid Chromatography - Advances and Perspectives, Vol. 2, Academic Press, New York 1980, S. 6.
57) K.K. Unger, Anal. Chem. 55 (1983) 361 A.
58) H. Colin, C. Eon und G. Guichon, J. Chromatogr. 119 (1976) 41.
59) H. Colin, C. Eon und G. Guichon, J. Chromatogr. 122 (1976) 223.
60) J.R. Benson und D.J. Woo, J. Chromatogr. Sci. 22 (1984) 386.
61) K.K. Unger, Porous Silica in J. Chromatogr. Lib., Vol 16, Elsevier New York (1979).
62) K.K. Unger, N. Becker und P. Roumeliotis, J. Chromatogr. 125 (1976) 115.
63) I. Halasz und I. Sebastian, Angew. Chem. 8 (1969) 453.
64) A. Pryde, J. Chromatogr. Sci. 12 (1974) 486.
65) D.C. Locke, J. T. Schmermund und B. Banner, Anal. Chem. 44 (1972) 90.
66) P. Roumeliotis und K.K. Unger, J. Chromatogr. 149 (1978) 211.
67) K. Karch, I. Sebastian und I. Halasz, J. Chromatogr. 122 (1976) 3.
68) L.C. Sander und S.A. Wise, J. Chromatogr. 316 (1984) 163.
69) H. Hemetesberger, W. Maasfeld und H. Ricken, Chromatographia 9 (1976) 303.
70) H. Hemetsberger, M. Kellermann und H. Ricken, Chromatographia 10 (1977) 726.

71) H. Hemetsberger, P. Behrensmeyer, J. Henning und H. Ricken, Chromatographia, 12 (1979) 71.
72) H. Engelhardt und G. Ahr, Chromatographia 14 (1981) 227.
73) N.L. Ha, J. Ungvarai und E. sz. Kovats, Anal. Chem. 45 (1982) 2410.
74) K. Szabo, N.L. Ha, P. Schneider, P. Zeltner und E. sz. Kovats, Hel. Chim. Acta 67 (1984) 2128.
75) D.B. Marshall, K.A. Stutler und C.H. Lochmüller, J. Chromatogr. Sci. 22 (1984) 217.
76) K.D. Lork, K.K. Unger und J.N. Kinkel, J. Chromatogr. 352 (1986) 199.
77) K.K. Unger, Porous Silica, J. Chromatogr. Library, Vol. 16, Elsevier Amsterdam (1979) S. 27.
78) Macherey und Nagel GmbH und Co KG, Gesamtkatalog 1985, D-5160 Düren.
79) Shandon HPLC Catalogue, 1983/84 ed. Shandon, Astmoor GB.
80) H. Engelhardt und G. Ahr, Chromatographia 14 (1981) 227.
81) A. Müller, Proc. Roy. Soc. A, 127 (1930) 417.
82) A. Müller, Proc. Roy. Soc. A, 138 (1932) 514.
83) A. Müller und K. Lonsdale, Acta Cryst. 1 (1948) 129.
84) S. Fitzwater und L.S. Bartell, J.A.C.S. 98 (1976) 8838.
85) I. Langmuir, J.A.C.S., 39 (1917) 1848.
86) I. Halasz, Anal. Chem. 52 (1980) 1393 A.
87) K.K. Unger, Porous Silica, J. Chromatogr. Library, Vol. 16, Elsevier Amsterdam (1979) S. 102.
88) K.D. Lork, Diplomarbeit, Mainz 1985.
89) S.G. Bush, J.W. Jorgenson, M.L. Miller und R.W. Linton, J. Chromatogr. 260 (1983) 1.
90) M.L. Hair, Infrared Spectroscopy in Surface Chemistry, Marcel Dekker, New York 1967.
91) L.H. Little, Infrared Spectra of Adsorbed Species, Academic Press, London 1966.
92) Y.V. Davydov und A.V. Kiselev, Russ. J. Phys. Chem. 77 (1963) 1404.
93) M.L. Miller, R.W. Linton, S.G. Bush und J.W. Jorgenson, Anal. Chem. 56 (1984) 2204.
94) C.H. Lochmüller, A.S. Colburn, M.L.Hunnicutt und J.M. Harris, Anal. Chem. 55 (1983) 1344.

95) C.H. Lochmüller, A.S. Colburn, M.L.Hunnicutt und J.M. Harris, J. Am. Chem. Soc. 106 (1984) 4077.
96) G.E. Berendsen, P.J. Schoenemakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony und J. Inczedy, J. Liq. Chromatogr. 3 (1980) 1669.
97) H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer-Verlag, 2. Aufl., Berlin 1979, S. 11.
98) R.M. McCormick und B.L. Karger, Anal. Chem. 52 (1980) 2249.
99) P.L. Zhu, Chromatographia 20 (1985) 425.
100) N.L. Ha, J. Ungvarai und E. sz. Kovats, Anal. Chem. 54 (1982) 2410.
101) G. Gutnikov und L.B. Hung, Chromatographia 19 (1984) 260.
102) A.M. Krstulvic, H. Colin und G. Guiochon, Anal. Chem. 54 (1982) 2438.
103) H. Engelhardt, H. Müller und B. Dreyer, Chromatographia 19 (1984) 240.
104) W.R. Melander, J.F. Erard und Cs. Horvath, J. Chromatogr. 282 (1983) 211.
105) W.R. Melander, J.F. Erard und Cs. Horvath, J. Chromatogr. 282 (1983) 229.
106) J. Frenz und Cs. Horvath, J. Chromatogr. 282 (1983) 249.
107) K. Jinno, Chromatographia 17 (1983) 367.
108) J.H. Knox und R. Kaliszan, J. Chromatogr. 349 (1985) 211.
109) W.K. Al-Thamir, J.H. Purnell, C.A. Wellington und R.J. Laub, J. Chromatogr. 173 (1979) 388.
110) R.J. Laub und S.J. Madden, J. Liq. Chromatogr. 8 (1985) 173.
111) H.J. Möckel und T. Freyholt, Chromatographia 17 (1983) 215.
112) R.J. Smith, J.K. Haken und M.S. Wainwright, J. Chromatogr., Chromatogr. Rev. 334 (1985) 95.
113) Uvasole - Lösungsmittel undsubstanzen für die Spektroskopie E. Merck AG, D-6100 Darmstadt.
114) D.E. Martire und R.E. Boehm, J. Phys. Chem. 87 (1983) 1045.
115) P.A. Bristow und J.H. Knox, Chromatographia 10 (1977) 279.
116) T. Daldrup und B. Kardel, Chromatographia 18 (1984) 81.
117) M. Verzele und C. Dewaele, Chromatographia 18 (1984) 84.
118) C. Gonnet. C. Bory und G. Lachatre, Chromatographia 16 (1982) 242.
119) B.A. Bidlingmeyer und F.V. Warren jr., Anal. Chem. 56 (1984) 1583 A.
120) Phase Seperations Ltd., GC and HPLC Catalogue 1985, Queensferry GB.
121) Merck Chromatographie Katalog 1984, E. Merck AG, D-6100 Darmstadt.

122) Whatman Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie/HPLC
Desaga Katalog 402 1984, D-6900 Heidelberg.

123) R. Enderle, I. Halasz und K. Unger, J. Chromatogr. 99 (1974) 377.

124) H. Engelhardt in: A. Henschen, K.P. Hupe, F. Lottspeich und W. Voelter (eds.), High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry, Verlag Chemie, Weinheim 1985, S. 34.

125) D.B. Marshall und W.P. McKenna, Anal. Chem. 56 (1984) 2090.

126) E. Breitmaier und W. Voelter, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim (1974), S. 110 ff.

127) E. Breitmaier, K.H. Spohn und S.Berger, Angew. Chem. 87 (1975) 152.

128) H.O. Kalinowski, S. Berger und S. Braun, ^{13}C-NMR-Spektroskopie Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1984, S. 559 ff.

129) F. Accascina, S. Petrucci und R.M. Fuoss, J. Am. Chem. Soc. 81 (1959) 1301.

130) W. Kuss, Z. ang. Phy. 7 (1955) 372.

131) E. Pertsch, T. Clerc, J. Seibel und W.Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer Verlag, Berlin 1976, S. C 120.

132) A.W. Ralston, C.W. Hoerr, W.O.Pool und H.J. Harward, J. org. Chem. 9 (1944) 102.

133) J.W. McBain und P.H. Richards, Ind. eng. Chem. 38 (1946) 643.

134) G. Wedler, Lehrbuch der Physikalischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim (1982), Seite 387 ff.

135) Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, Viertes Ergänzungswerk, Band 4/1, Springer-Verlag, Berlin 1977.

136) P.H. Emmet und S. Brunauer, J. Am. Chem. Soc. 59 (1937) 1553.

137) J. Köhler, D.B. Chase, R.D. Farlee, A.J. Vega und J.J. Kirkland, J. Chromatogr. 352 (1986) 275.

LEBENSLAUF

Name:	Aran Paulus
Geburtsdatum:	14. Juli 1957
Geburtsort:	Völklingen-Saar

Schulbildung

1964 - 1967	Katholische Volksschule Lauterbach
1967 - 1969	Staatliches Realgymnasium Völklingen
1969 - 1976	Staatliches Warndtgymnasium Geislautern
22. Mai 1976	Reifeprüfung am Warndtgymnasium Geislautern

Universitätsausbildung

Oktober 76 - März 80	Universität Saarbrücken Chemie- und Sportstudium
März 79	Vordiplom Chemie
April 80 - März 83	Universität Tübingen Chemie- und Sportstudium
Juni 82	mündliche Diplomprüfung Chemie
Oktober 82 - März 83	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Ernst Bayer, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen mit dem Thema: "Pilotstudien über eine Sequenzanalyse im Picomol-bereich und pharmakokinetische Untersuchungen mittels HPLC"
Juni 83 - März 86	experimenteller Teil der Dissertation "Chromatographische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zum Trennmechanismus an reversed-phase-Materialien" am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. Ernst Bayer
	Graduiertenstipendium der Hanns-Seidel-Stiftung, München

Meine akademische Ausbildung verdanke ich folgenden Damen und Herren:

in Saarbrücken	E. Blasius, R. Berger, H. Dürr, H. Engelhardt, L. Gräser-Capuano, U. Kreibig, I. Halasz, H.D. Hardt, L. Heck, H. Müser, J. Petersson, K. Schank, H.J. Schneider und F. Seel,
in Tübingen	E. Bayer, W. Braun, H. Eckstein, G. Gauglitz, G. Häfelinger, M. Hanack, V. Hoffmann, S. Kemmler-Sack, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, W. Rundel, F.F. Seelig, J. Strähle und W. Zeil.

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/64321